

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



TESIS DOCTORAL

Caracterización del sistema Regulador de Dos Componentes
Híbrido TolR en *Azoarcus* sp. CIB

ZAIRA MARTÍN MOLDES

MADRID, 2014

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**



TESIS DOCTORAL

**Caracterización del sistema Regulador de Dos Componentes
Híbrido TolR en *Azoarcus* sp. CIB**

**ZAIRA MARTÍN MOLDES
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA**

DIRECTORES:

Dr. EDUARDO DÍAZ FERNÁNDEZ

Dr. M^a TERESA ZAMARRO MOLINA

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS**



"Quien no haya experimentado la irresistible atracción de la ciencia, no podrá comprender su tiranía."

Frankenstein. Mary Shelley

"Nunca olvides que basta una persona o una idea para cambiar tu vida para siempre, ya sea para bien o para mal."

Jackson Brown

"Nadie que no haya nacido sólo para eso y esté dispuesto a vivir sólo para eso podría persistir en un oficio tan voraz, cuya obra se acaba después de cada noticia, como si fuera para siempre, pero que no concede ni un instante de paz mientras no vuelva a empezar con más ardor que nunca en el minuto siguiente."

Gabriel García Márquez

A MIS PADRES

A MI HERMANO

A FRAN

AGRADECIMIENTOS

Cuatro años han pasado desde que comencé mi andadura en el laboratorio, y al finalizar un trabajo tan laborioso y lleno de dificultades como es la elaboración de una tesis, es inevitable no recordar todo lo pasado y que esto no lo hubieras podido lograr sin el apoyo de tanta gente a la que tengo mucho que agradecer.

En primer lugar, a mis directores de Tesis, Dr. Eduardo Díaz Fernández y Dra. M^a Tereza Zamarro Molina, mi más sincero agradecimiento. A Eduardo por haberme confiado este trabajo, por su gran capacidad, por su paciencia, valiosa dirección y por saber sacar el máximo rendimiento de cada uno de nosotros.

A Tere cuya experiencia y saber hacer han sido mi fuente de motivación. Has sido mi pilar, mi enciclopedia particular sobre *Azoarcus* (y muchos más temas tanto intra como extra “curriculares”) y mi principal apoyo. Sabes que has tenido un papel muy importante en que consiguiese llegar a esta meta.

Gracias a los “otros jefes” del grupo, Jose Luis y Auxi, por vuestras aportaciones a este trabajo.

En este punto, quiero agradecer a la Prof. Caroline Harwood, en primer lugar haberme recibido en su grupo de investigación en la Universidad de Seattle. En segundo lugar, por sus consejos y su gran sabiduría y apoyo y ánimo que me brindó durante mi estancia donde he podido tener la oportunidad de aprender y acabar una parte de este trabajo.

Gracias también a Lola, Haydeé y Ruth del servicio de Bioinformática por su inestimable trabajo en el análisis de los datos de transcriptómica y el modelo tridimensional de la proteína.

Por supuesto no puedo olvidarme de mis compañeros de Biodegradación. A los que estaban cuando llegué, a Manuel, gracias por estar ahí; Javier (qué puedo decir de ti que ya no sepas) y Andrés (el agujero negro del 342), gracias por recibirme en el 342 con tanto cariño y por vuestra paciencia con esta novata; Isa (mi perfecta cuadrículada favorita), Virginia (mi antibiótico favorito) y Nina, muchas gracias por los buenos ratos que me habéis hecho pasar tanto dentro como fuera del labo. A los que siguen, Ana (no pares de crear), gracias por ser la base de nuestra investigación y hacer tan bien tu trabajo aunque no te lo pongamos fácil. A Esther y Bea, gracias por ser tan marchosas y por incitarme a correr por las mañanas.

A los que llegastéis a la vez, la autodenominada *New Generation*, Carlos, Rober, Julia y Loreine, por vuestras charlas y corrillos en el pasillo (como reza el refrán “mal de muchos...”), y por saber encontrar las palabras de ánimo necesarias.

A Fernando, por tu gran ayuda tanto dentro (¿¿qué habría hecho yo sin ti con el HPLC??) como fuera del laboratorio, por saber escuchar y por tu saber estar. A Carmen, por tu incondicional amistad, por ser más que una compañera de trabajo, por dar los mejores consejos del mundo y por ser la mejor cocinera-repostera del mundo. Vuestro apoyo ha sido muy importante durante esta larga andadura.

A los que han llegado, Helga, eres el futuro del 342 y no dudo de que dejarás el pabellón muy alto; Cris, Natalia, Lorena, Inma, y Olga, gracias por vuestros ánimos; Juan, Gonn, Igor y Lucía, por vuestros puntos de vista y por vuestras aportaciones científicas.

Gracias a todos los componentes de los pneumos. Ernesto, gracias por ser un gran ejemplo a seguir, por ser una enciclopedia con piernas y por compartirlo con todos;

Pedro, Miriam M, Elo, Elisa, Miri,...(y todavía me dejaré a alguien), gracias por toda la ayuda prestada.

Finalmente, gracias a mi familia, por soportarme hablando de “bichitos” y cosas raras que sólo yo entendía. Esta tesis no sería posible si no me hubieseis ayudado y apoyado hasta el final. Gracias Fran por ser todo lo que necesito y más, por saber entenderme y por ayudarme sin pedirlo. Gracias por aguantarme en las buenas y en las malas.

RESUMEN

La biodegradación bacteriana de compuestos aromáticos requiere que las células ajusten sus programas celulares para hacer frente al carácter dual de estos compuestos, ya que, si bien son una fuente de carbono y energía para los microorganismos, muchos de ellos son también un importante factor de estrés debido a su carácter tóxico. En esta tesis se ha utilizado como sistema modelo de estudio la β -proteobacteria *Azoarcus* sp. CIB, capaz de mineralizar tanto aeróbica como anaeróbicamente numerosos compuestos aromáticos. El análisis detallado de su ruta periférica de degradación anaeróbica de tolueno y *m*-xileno (genes *bbs-bss*), ha revelado la presencia de un gen, denominado *tolR*, que no tiene homólogos en otros organismos. Dicho gen codifica la proteína TolR que presenta una arquitectura modular atípica, y que se corresponde con la de un nuevo miembro de los sistemas reguladores de dos componentes híbridos (HTCSs), donde el componente histidín quinasa sensora y el componente regulador de respuesta aparecen fusionados en un único polipéptido.

Este trabajo ha demostrado que la proteína TolR es el primer HTCS que responde a hidrocarburos aromáticos y cuyo dominio efector es una actividad enzimática. Su mecanismo molecular de actuación implica la detección, a través de su dominio sensor PAS, de hidrocarburos aromáticos que actúan como inductores, lo que activa una cascada de autofosforilación y transferencia intramolecular del grupo fosfato desde el dominio autoquinasa al dominio *receiver*, logrando así la activación de la región efectora con actividad fosfodiesterasa de di-GMPc. La presumible disminución de los niveles de di-GMPc en *Azoarcus* sp. CIB favorece la quimiotaxis anaeróbica hacia los hidrocarburos aromáticos, y participa en la respuesta de resistencia tras la exposición a concentraciones tóxicas de dichos hidrocarburos, siendo la primera vez que se demuestra la participación del di-GMPc en la adaptación bacteriana a los hidrocarburos aromáticos. Los resultados de los análisis transcriptómicos realizados comparando la cepa parental *Azoarcus* sp. CIB con la cepa mutante en el gen *tolR*, *Azoarcus* sp. CIB*dtolR*, confirman que TolR está implicado en una red de señalización celular que controla los programas morfológico, metabólico y de estrés implicados en la adaptación anaeróbica a los hidrocarburos aromáticos y en otros procesos que condicionan el normal crecimiento anaeróbico en fuentes de carbono no aromáticas.

SUMMARY

Biodegradation of aromatic compounds requires that bacteria adjust their cellular programs to cope with the dual character of such compounds, i.e., on the one side they are an important carbon and energy sources but, on the other side, they behave as stressors due to their toxic nature. In this thesis, we have used *Azoarcus* sp. CIB, a β -proteobacterium that is able to mineralize both aerobically and anaerobically a wide range of aromatic compounds, as model system. A detailed analysis of the *bss-bbs* cluster, encoding the peripheral route for the anaerobic degradation of toluene, has revealed the presence of a unique gene, *tolR*, that has no homologs in other organisms. The TolR protein shows an atypical modular architecture which corresponds to a new hybrid two-component system (HTCS), where the sensor histidine-kinase and the response regulator components are fused together in a single polypeptide.

This work has demonstrated that TolR is the first HTCS that responds to aromatic hydrocarbons and whose response regulator has an enzymatic activity. The molecular mechanism of action of TolR involves the detection of aromatic hydrocarbons (inducers) through the PAS sensor domain. Then, an autophosphorylation and intramolecular phosphotransfer from the autoquinase domain to the receiver domain triggers the c-di-GMP phosphodiesterase activity of the effector domain. TolR activation in anaerobic conditions involves decreased c-di-GMP levels, that lead to an effective anaerobic chemotaxis towards aromatic hydrocarbons, and contribute to the cell resistance response after exposure to toxic concentrations of aromatic hydrocarbons. This is the first time that c-di GMP was shown to be involved in the bacterial adaptation to aromatic hydrocarbons. Transcriptomic studies that compare the wild-type *Azoarcus* sp. CIB strain and the *tolR* mutant *Azoarcus* sp. CIB*dtolR* strain, confirm that TolR is involved in a signaling network that controls the morphological, metabolic and stress response programs involved in the anaerobic adaptation to aromatic hydrocarbons, as well as other processes responsible for the normal growth in non-aromatic carbon sources.

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| RESUMEN | i |
| SUMMARY | iii |
| I. CLAVE DE ABREVIATURAS | 1 |
| II. INTRODUCCIÓN | 5 |
| 1. Degradación bacteriana de los compuestos aromáticos | 7 |
| 2. La implicación de los sistemas reguladores de dos componentes (TCS) en la transducción de señales. | 9 |
| 2.1. Distribución de los TCS | 10 |
| 2.2. Reacciones de transferencia del grupo fosfato | 10 |
| 2.3. Histidina quinasas sensoras (HKs) | 11 |
| 2.4. Reguladores de respuesta (RRs) | 14 |
| 2.5. Evolución de los TCSs..... | 15 |
| 3. Sistemas reguladores de dos componentes híbridos (HTCSs) | 16 |
| 4. El segundo mensajero celular di-GMPc..... | 18 |
| 4.1. Metabolismo del di-GMPc..... | 20 |
| 4.2. Proteínas que contienen tanto dominios DGC como PDE..... | 21 |
| 4.3. Tipos de receptores de di-GMPc | 22 |
| 4.4. Fenotipos regulados por el di-GMPc | 23 |
| 5. TolR es un sistema regulador de dos componentes híbrido (HTCS) de <i>Azoarcus</i> sp. CIB. | 24 |
| III. OBJETIVOS..... | 27 |
| IV. MATERIALES Y MÉTODOS | 31 |
| 1. Cepas bacterianas y plásmidos | 33 |
| 2. Medios y condiciones de cultivo | 34 |
| 2.1. Medios de cultivo empleados para <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 34 |
| 2.2. Medios de cultivo empleados para <i>Azoarcus</i> sp. CIB | 35 |
| 2.3. Obtención de condiciones anaeróbicas en los medios de cultivo..... | 36 |
| 2.4. Condiciones de cultivo | 36 |
| 2.5. Conservación de las cepas bacterianas | 37 |
| 3. Técnicas de manipulación de DNA y RNA | 37 |
| 3.1. Extracción y purificación de DNA..... | 38 |
| 3.2. Reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente (PCR) | 38 |
| 3.3. Secuenciación automática de DNA..... | 40 |
| 3.4. Extracción y purificación de RNA..... | 41 |
| 3.5. Ensayos de retrotranscripción (RT-PCR) y RT-PCR en tiempo real | 41 |
| 3.6. Mutagénesis dirigida del gen <i>tolR</i> : construcción de los plásmidos pIZtolR ^{H190V} y pIZtolR ^{F79A} | 42 |
| 3.7. Construcción de las fusiones génicas <i>tolR</i> -His ₆ , <i>tolR</i> ^{H190V} -His ₆ , <i>tolR</i> _{SK} -His ₆ e Int- <i>tolR</i> _{RR} | 44 |
| 3.8. Construcción de los plásmidos pIZtolR _{RR} y pIZtolR _{SK-RR} | 45 |
| 4. Procedimientos de transferencia génica | 45 |

| | |
|---|----|
| 4.1. Transformación de células de <i>E. coli</i> y <i>P. aeruginosa</i> mediante choque térmico y electroporación | 45 |
| 4.2. Transformación de células de <i>Azoarcus</i> sp. CIB mediante electroporación..... | 46 |
| 5. Ensayos de choque de tolueno | 46 |
| 6. Ensayos de quimiotaxis | 47 |
| 6.1. Ensayo de quimiotaxis a tiempos cortos (Agarose Plug Assay)..... | 47 |
| 6.2. Ensayo de quimiotaxis en placas de cultivo | 48 |
| 7. Ensayo de formación de biopelículas en placas multipocillo | 48 |
| 8. Técnicas de manipulación de proteínas | 48 |
| 8.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) | 48 |
| 8.2. Sobreproducción y purificación de proteínas..... | 49 |
| 8.2.1. Sobreproducción y purificación de TolR y TolR ^{H190V} | 49 |
| 8.2.2. Sobreproducción y purificación de TolR _{SK} | 50 |
| 8.2.3. Sobreproducción y purificación de TolR _{RR} | 50 |
| 9. Ensayos de actividad enzimática | 51 |
| 9.1. Ensayos de actividad β -galactosidasa..... | 51 |
| 9.2. Ensayo de actividad autoquinasa | 52 |
| 9.3. Ensayos de transferencia intramolecular del fosfato en TolR..... | 52 |
| 9.4. Ensayos de transferencia intermolecular del fosfato o transfosforilación <i>in vitro</i> | 53 |
| 9.5. Ensayos de consumo de ATP | 53 |
| 9.6. Ensayo enzimático de actividad fosfodiesterasa (PDE) | 53 |
| 10. Análisis transcriptómicos | 54 |
| 10.1. Construcción de librerías de cDNA para análisis transcriptómicos..... | 54 |
| 10.2. Análisis bioinformático de las secuencias: mapeo de lecturas y cuantificación de los transcritos | 56 |
| 10.3. Cuantificación de la expresión diferencial..... | 56 |
| 11. Recursos informáticos | 57 |
| 11.1. Análisis bioinformáticos..... | 57 |
| 11.2. Análisis estadísticos | 58 |
| V. RESULTADOS | 59 |
| 1. El gen <i>tolR</i> está implicado en la adaptación anaeróbica de <i>Azoarcus</i> sp. CIB a los hidrocarburos aromáticos | 61 |
| 1.1. El gen <i>tolR</i> está implicado en la quimiotaxis de <i>Azoarcus</i> sp. CIB a tolueno en anaerobiosis | 61 |
| 1.2. El gen <i>tolR</i> no afecta a la movilidad general de <i>Azoarcus</i> sp. CIB en anaerobiosis..... | 66 |
| 1.3. El gen <i>tolR</i> controla la quimiotaxis anaeróbica de <i>Azoarcus</i> sp. CIB a los hidrocarburos aromáticos..... | 67 |
| 1.4. El gen <i>tolR</i> está implicado en la adaptación de <i>Azoarcus</i> sp. CIB a una exposición súbita a tolueno. | 70 |
| 2. Caracterización molecular de la proteína TolR | 72 |
| 2.1. TolR es una autoquinasa dependiente de tolueno. | 72 |
| 2.1.1. Clonaje e hiperexpresión del gen <i>tolR</i> y purificación de la proteína TolR. | 72 |

| | |
|--|-----|
| 2.1.2. TolR se fosforila <i>in vitro</i> de manera dependiente de tolueno. | 73 |
| 2.1.3. El residuo His ¹⁹⁰ es esencial para la actividad autoquinasa de TolR..... | 75 |
| 2.1.4. Estudio del rango de efectores de TolR..... | 77 |
| 2.2. TolR es una histidina quinasa que cataliza la transferencia intramolecular de fosfato | 81 |
| 2.3. TolR es una fosfodiesterasa de di-GMPc activa en condiciones anaeróbicas..... | 82 |
| 2.4. TolR se induce en presencia de tolueno <i>in vivo</i> | 85 |
| 2.5. TolR es un HTCS que responde <i>in vivo</i> a distintos compuestos efectores de manera dosis-dependiente | 88 |
| 2.6. El residuo Phe ⁷⁹ del dominio sensor PAS está implicado en la interacción con las moléculas efectoras de TolR..... | 89 |
| 2.7. Comparación del sistema HTCS TolR con el sistema regulador de dos componentes clásico (CTCS) artificial TolR _{SK-RR} | 92 |
| 2.7.1. Clonaje e hiperexpresión del componente quinasa sensor (TolR _{SK}) y el componente regulador de respuesta (TolR _{RR}) | 92 |
| 2.7.2. TolR _{SK} cataliza su autofosforilación y se activa por tolueno | 94 |
| 2.7.3. La proteína TolR _{SK} fosforila en <i>trans</i> al regulador de respuesta TolR _{RR} | 95 |
| 2.7.4. La transferencia de fosfato es más eficiente en TolR que en el sistema CTCS TolR _{SK} -TolR _{RR} | 97 |
| 2.7.5. El sistema CTCS TolR _{SK} -TolR _{RR} es funcional <i>in vivo</i> | 98 |
| 2.7.6. El sistema HTCS TolR es más eficiente que el sistema CTCS TolR _{SK} -TolR _{RR} <i>in vivo</i> | 101 |
| 3. Identificación de genes implicados en la cascada de señalización controlada por el gen <i>tolR</i> | 102 |
| 3.1. La hidrólisis de di-GMPc restaura la resistencia a tolueno en la cepa <i>Azoarcus</i> sp. CIB <i>dtolR</i> | 103 |
| 3.2. El gen <i>tolR</i> también está implicado en aspectos de la fisiología de <i>Azoarcus</i> sp. CIB que no dependen de la presencia de hidrocarburos aromáticos | 104 |
| 3.2.1. El gen <i>tolR</i> está implicado en la adaptación de <i>Azoarcus</i> sp. CIB al crecimiento anaeróbico en piruvato | 104 |
| 3.2.2. El gen <i>tolR</i> está implicado en la formación de biopelículas en <i>Azoarcus</i> sp. CIB..... | 106 |
| 3.2.3. El gen <i>tolR</i> está implicado en la agregación celular en <i>Azoarcus</i> sp. CIB..... | 107 |
| 3.3. Análisis transcriptómico comparativo entre la cepa parental <i>Azoarcus</i> sp. CIB y la cepa mutante <i>Azoarcus</i> sp. CIB <i>dtolR</i> | 108 |
| 3.3.1. Secuenciación masiva del mRNA | 108 |
| 3.3.2. Análisis de las lecturas y normalización de las muestras | 109 |
| 3.3.3. Análisis de los genes diferencialmente expresados entre la cepa parental <i>Azoarcus</i> sp. CIB y la cepa mutante <i>Azoarcus</i> sp. CIB <i>dtolR</i> | 111 |
| VI. ANEXO I | 123 |
| VII. DISCUSIÓN | 127 |

| | |
|--|-----|
| 1. El gen <i>tolR</i> está implicado en la adaptación anaeróbica de <i>Azoarcus</i> sp. CIB a los hidrocarburos aromáticos | 130 |
| 2. Caracterización molecular del sistema regulador de dos componentes híbrido TolR de <i>Azoarcus</i> sp. CIB..... | 131 |
| 3. Identificación de genes implicados en la cascada de señalización controlada por TolR..... | 138 |
| 4. Modelo del mecanismo de acción propuesto para TolR en <i>Azoarcus</i> sp. CIB | 144 |
| VIII. CONCLUSIONES..... | 147 |
| IX. BIBLIOGRAFÍA | 151 |

I. CLAVE DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------------|--|
| A | adenina |
| A₆₀₀ | densidad óptica medida a 600 nm |
| AK | dominio autoquinasa |
| Ap₄A | diadenosina tetrafosfato |
| Ap^R | resistencia a ampicilina |
| b | base (s) |
| Bq | Bequerelio (2.7x10 ⁻¹¹ Ci) |
| BTEX | acrónimo <u>B</u> enceno- <u>T</u> olueno- <u>E</u> tilbenceno- <u>X</u> ileno |
| C | citosa |
| °C | grado centígrado |
| CA | dominio catalítico de las Histidín quinasas |
| cDNA | DNA complementario |
| CDS | secuencia codificante (del inglés, <i>Co<u>D</u>ing <u>S</u>equence</i>) |
| CECT | <u>C</u> olección <u>E</u> spañola de <u>C</u> ultivos <u>T</u> ipo |
| CFA | medio <i>Colony <u>F</u>orming <u>A</u>ntigen</i> |
| Ci | Curio (3.7x10 ¹⁰ Bq) |
| COG | <i>Cluster</i> de genes ortólogos (del inglés, <i>Cl<u>u</u>ster of <u>O</u>rtologous <u>G</u>enes</i>) |
| CRP | proteína receptora de AMPc |
| CTCS | sistema de dos componentes clásico (del inglés, <i>Cl<u>a</u>ssical <u>T</u>wo-component system</i>) |
| C-terminal | extremo carboxilo |
| DEG | Genes diferencialmente expresados (del inglés, <i>Di<u>f</u>ferentially <u>E</u>xpressed <u>G</u>enes</i>) |
| DGC | diguamilato ciclase |
| di-AMPc | ácido di-(3' 5') adenosín-monofosfato cíclico |
| di-GMPc | ácido di-(3' 5') guanosín-monofosfato cíclico |
| DHp | dominio de dimerización de las Histidina quinasas |
| DMSO | dimetilsulfóxido |
| DTT | ditiotreitól |
| EAL | Motivo Glu-Ala-Leu |
| EPS | exopolisacáridos |
| G | guanina |
| GGDEF | motivo Gly-Gly-Asp-Glu-Phe |
| Gm^R | resistencia a gentamicina |
| h | hora |
| HD-GYP | motivo His-Asp Gly-Tyr-Pro |
| His₆ | secuencia de aminoácidos compuesta por 6 histidinas |
| HK | componente Histidina quinasa |
| HMN | <u>H</u> epta <u>m</u> etil <u>n</u> onano |
| HPT | histidín fosfotransferasa (del inglés, <i>Hi<u>s</u>tidine <u>P</u>hospho<u>t</u>ransfer protein</i>) |
| HTCS | sistema regulador de dos componentes híbrido (del inglés, <i>Hybrid <u>T</u>wo-Component <u>S</u>ystem</i>) |
| HTH | motivo hélice-giro-hélice |
| IPTG | isopropil-β-D-tiogalatopiranósido |
| kb | kilobase |
| K_D | constante de disociación aparente |
| kDa | 1000 Dalton |

| | |
|-----------------------|--|
| Km^R | resistencia a kanamicina |
| LB | medio <i>Lysogeny Broth</i> |
| MA | medio basal para cultivos anaerobios |
| MC | medio MA complementado |
| MCP | proteínas aceptoras de grupos metilo (<i><u>M</u>ethyl-accepting <u>C</u>hemotaxis <u>P</u>rotein</i>) |
| min | minute |
| mRNA | RNA mensajero |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| nm | nanómetro |
| nt | nucleótido(s) |
| N-terminal | extremo amino |
| OCS | Sistema regulador de un componente (del inglés, <i><u>O</u>ne <u>C</u>omponent <u>S</u>ystem</i>) |
| ORF | pautas de lectura abierta (del inglés, <i><u>O</u>pen <u>R</u>eadin<u>G</u> <u>F</u>rame</i>) |
| P/Pi | Grupo fosfato |
| PAGE | electroforesis en gel de poliacrilamida |
| PAS | dominio sensor (del inglés, <i><u>P</u>er-<u>A</u>RNT-<u>S</u>im</i>) |
| pb | pares de bases |
| PCR | reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente |
| PDE | fosfodiesterasa |
| pGpG | 5'-fosfoguanilil(3'-5')-guanosina |
| ppGpp | Guanosin-3',5'-Bisdifosfato |
| REC | dominio <i>receiver</i> del regulador de respuesta |
| RNA-seq | secuenciación de RNA |
| RR | componente regulador de respuesta |
| rRNA | RNA ribosomal |
| RPKM | unidad de normalización de lecturas por gen en RNA-seq (del inglés, <i><u>R</u>eads <u>P</u>er <u>K</u>b of transcript per <u>M</u>illion mapped reads</i>) |
| rpm | revoluciones por minuto |
| RT-PCR | reacción de retrotranscripción acoplada a PCR |
| SDS | dodecilsulfato sódico |
| T | timina |
| TAE | tampón Tris-Acetato-EDTA |
| TB | medio <i>Terrific Broth</i> |
| TCS | sistema regulador de dos componentes (del inglés, <i><u>T</u>wo-component system</i>) |
| TE | tampón Tris-EDTA |
| TM | transmembrana |
| tRNA | RNA de transferencia |
| u.a. | unidad arbitraria |
| ufc | <u>U</u> nidad <u>f</u> ormadora de <u>c</u> olonia |

II. INTRODUCCIÓN

1. Degradación bacteriana de los compuestos aromáticos.

Los compuestos aromáticos, constituyen, después de los carbohidratos, la clase de compuestos orgánicos más abundante en la naturaleza (Adler, 1977). Las principales fuentes naturales de compuestos aromáticos son los flavonoides, ligninas, taninos, aminoácidos aromáticos y los combustibles fósiles (Gibson y Harwood, 2002). La elevada estabilidad termodinámica del anillo bencénico ha permitido el uso de los compuestos aromáticos en muchos campos de la industria (disolventes, insecticidas, polímeros artificiales, etc.) (Swoboda-Colberg, 1995). Sin embargo, la elevada estabilidad de los compuestos aromáticos conlleva una elevada persistencia de éstos en el ambiente lo que, en muchos casos, supone un importante factor de contaminación medioambiental (McLeod y Eltis, 2008). El carácter tóxico de los compuestos aromáticos sobre los organismos es debido a los daños que producen en la membrana celular, los ácidos nucleicos y ciertas proteínas citoplasmáticas, pudiendo ocasionar la muerte celular (de Smet y cols., 1978; Sikkema y cols., 1992). No obstante, los compuestos aromáticos tienen un carácter dual ya que si bien son una fuente de estrés también representan una importante fuente de carbono y energía para ciertos microorganismos especialmente bacterias, que son capaces de degradarlos. La biodegradación bacteriana de compuestos aromáticos, tales como los hidrocarburos BTEX (mezcla de benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos), requiere que las células ajusten sus programas celulares para hacer frente tanto a la situación de estrés que generan dichos compuestos por su toxicidad intrínseca como al programa metabólico necesario para su mineralización (Ramos y cols., 2002; Jiménez y cols., 2010). El ajuste de los programas celulares para la degradación de compuestos aromáticos implica toda una compleja red de sistemas de detección y transducción de señales que están acoplados a las redes de regulación global de la célula (Díaz y cols. 2013).

Los microorganismos han desarrollado dos estrategias principales para degradar compuestos aromáticos dependiendo de la presencia o ausencia de oxígeno, a través de una gran variedad de rutas periféricas que convergen en unas pocas rutas centrales, lo que se conoce con el nombre de “embudo catabólico” (Harayama y Timmis, 1989; Heider y Fuchs, 1997; Fuchs, 2008; Díaz y cols., 2013). En el catabolismo aeróbico de los compuestos aromáticos, ampliamente estudiado, el oxígeno no sólo actúa como aceptor final de electrones, sino que además es un co-sustrato en dos procesos

esenciales como son la hidroxilación y la rotura del anillo aromático, llevados a cabo por oxigenasas (Parales y Resnick, 2006; Vaillancourt y cols., 2006; Carmona y cols., 2009; Vilches-Vargas *et al.*, 2010; Pérez-Pantoja *et al.*, 2012; Díaz y cols., 2013). En el catabolismo anaeróbico, los compuestos aromáticos siguen una estrategia catabólica basada en reacciones de reducción capaces de desaromatizar el anillo aromático (Gibson y Harwood, 2002; Fuchs, 2008), empleando aceptores finales de electrones tales como el NO^{3-} (Spormann y Widdel, 2000), el Fe^{3+} o el SO_4^{2-} (Morasch y cols., 2004; Peters y cols., 2004) o algunos otros menos comunes como el Mn^{2+} , ClO_4^- o el selenato (Coates y cols., 2002; Gibson y Harwood, 2002; Lovley, 2003; Coates y Achenbach, 2004) siendo también posible la degradación anaeróbica en condiciones de fermentación o en organismos fotótrofos (Gibson y Harwood, 2002).

La identificación de cepas bacterianas presentes en los ambientes anóxicos contaminados por compuestos aromáticos, revela la presencia frecuente de microorganismos pertenecientes al género *Azoarcus* (Lin y cols., 2002). Entre sus miembros se encuentran bacterias desnitrificantes anaerobias estrictas, tales como *A. anaerobius* (Springer y cols., 1998), y anaerobias facultativas, tales como *A. evansii* (Anders y cols., 1995), *A. tolulyticus* (Zhou y cols., 1995), *A. toluvorans* (Fries y cols., 1994), *A. toluclasticus* (Song y cols., 1999), *A. buckelii* (Mechichi y cols., 2002) y la cepa EbN1, inicialmente identificada como miembro del género *Azoarcus* pero que se clasifica actualmente como "*Aromatoleum aromaticum*" (Rabus y Widdel, 1995; Rabus y cols., 2005; Wöhlbrand, 2007), todas ellas capaces de degradar anaeróbicamente compuestos aromáticos. Todos los miembros del actual género *Azoarcus* son móviles, debido en la mayoría de los casos a un flagelo polar (Anders *et al.*, 1995; Song *et al.*, 1999), y casi todos ellos presentan morfología de diplobacilo, si bien algunas cepas cultivadas en *m*-xileno en condiciones desnitrificantes presentan morfología de tipo coco (Hess *et al.*, 1997).

Para la realización de esta tesis doctoral, se ha utilizado la cepa *Azoarcus* sp. CIB (CECT 5669) (López-Barragán y cols., 2004). Esta cepa es capaz de degradar una amplia variedad de compuestos aromáticos, entre los que se encuentran los hidrocarburos tolueno y *m*-xileno, tanto aeróbica como anaeróbicamente (López-Barragán y cols., 2004; Carmona y cols., 2009; Blázquez, 2009). Durante los últimos años nuestro grupo ha identificado y caracterizado varios de los sistemas de regulación que controlan el

catabolismo anaeróbico de los compuestos aromáticos en *Azoarcus* sp. CIB (Durante-Rodríguez y cols., 2006, 2008, 2010; Valderrama y cols., 2012, 2014; Juárez y cols., 2013), por lo que esta bacteria constituye actualmente uno de los microorganismos modelo empleados para ampliar los estudios sobre la genética y regulación de las rutas anaeróbicas de degradación de compuestos aromáticos.

2. La implicación de los sistemas reguladores de dos componentes (TCS) en la transducción de señales.

La adaptación al medio es un proceso esencial para la supervivencia de los microorganismos, por lo que éstos han desarrollado una compleja red de mecanismos de control y regulación que desencadena una respuesta global en base al estado fisiológico y metabólico de la célula. Los sistemas que permiten a las células detectar y responder a una nueva situación se denominan sistemas de transducción de señales. Estos sistemas funcionan percibiendo la llegada de un estímulo externo y transmitiendo la información recibida al interior de la célula generando así respuestas adaptativas específicas (Stock y cols., 2000; West y Stock, 2001; Gao y Stock, 2009; Casino y cols., 2010; Krell y cols., 2010; Capra y cols., 2010, 2012).

Los sistemas reguladores de dos componentes (TCS) son los principales sistemas de transducción de señales en procariotas (Stock y cols., 2000; Ulrich y cols., 2005; Krell y cols., 2010). Han sido descritos sistemas de dos componentes que regulan diversas respuestas entre las que se incluyen una amplia variedad de procesos esenciales para la célula como la adquisición de nutrientes (carbono, nitrógeno, fósforo), actividad metabólica (sistema de transporte de electrones y catabolismo), virulencia, adaptación física y química al medio (pH, osmolaridad, quimiotaxis), desarrollo (esporulación, ciclo celular) y resistencia a antibióticos (Grebe y Stock, 1999; Hoch, 2000; Parkinson y Kofoed, 1992; Stock y cols., 2000; Krell y cols., 2010).

Los TCS están generalmente compuestos por dos proteínas, una proteína histidina quinasa sensora (HK) que al percibir un estímulo se fosforila en un residuo de His conservado y realiza la transferencia de fosfato a un residuo Asp conservado de una proteína reguladora de la respuesta (RR), provocando la activación de ésta última. Si bien esta es la definición clásica de TCS, la cascada de fosforilación puede presentar distintos grados de complejidad incluyendo proteínas reguladoras y dominios

fosfotransferasa y fosfatasa adicionales (Stock y cols., 2000; Mascher y cols. 2006; Buelow y Raivio, 2010)

2.1. Distribución de los TCS.

Los TCSs están presentes en los organismos procariotas, e.g., en la mayoría de las bacterias, y en algunas arqueas. Sin embargo, en los últimos años, se han encontrado TCS similares en algunos eucariotas (plantas, hongos y protozoos) que podrían haber sido adquiridos de procariotas mediante transferencia horizontal de genes (West y Stock, 2001; Alm y cols., 2006; Wuichet y cols., 2010). El número de TCSs en bacterias es dependiente de la fisiología, capacidad de adaptación a diferentes hábitats y complejidad del genoma de cada microorganismo, de manera que cuanto mayor sea cualquiera de estos parámetros, mayor será la necesidad del microorganismo de regular las actividades celulares (Ashby, 2004, 2006) y por tanto mayor número de TCSs presentará (Galperin, 2005). Por ejemplo, en un extremo se incluyen *Myxococcus xanthus* o *Nostoc punctiforme* con más de 130 TCS, mientras que especies del género *Mycoplasma*, parásitos intracelulares obligados, se encuentran en el otro extremo, entre las escasas excepciones de organismos que no poseen ningún gen que codifica para TCS (Mizuno, 1998; Stock y cols., 2000; Capra y Laub, 2012). En los organismos eucariotas, las HKs son menos abundantes, encontrándose por ejemplo entre una y ocho en organismos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* o *Arabidopsis thaliana*. No existen genes de HK o RR en los genomas secuenciados de *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* u *Homo sapiens*, de modo que muy probablemente los TCSs están ausentes en el reino animal (Wolanin y cols., 2002; Capra y Laub, 2012).

2.2. Reacciones de transferencia del grupo fosfato.

Los TCS realizan la transducción de la señal por medio de un mecanismo de fosforilación/desfosforilación (Fig. 1) (Kleerebezem y cols., 1997; Laub y cols., 2007). Por lo tanto, el control en un TCS está ligado a la habilidad de la HK de regular el estado de fosforilación de su RR y controlar el equilibrio de éste último hacia la forma activa. Además de dirigir la reacción de autofosforilación y transferencia, muchas HK poseen actividad fosfatasa, lo que les permite defosforilar a sus respectivos RR (Fig. 1).

La intensidad y duración de la respuesta, por tanto, depende en gran medida de la vida media del estado fosforilado del RR, la cual a su vez es dependiente de la propia actividad autofosfatasa intrínseca del RR, y/o de la actividad fosfatasa de la correspondiente HK (Gao y Stock, 2009; Galperin, 2010).

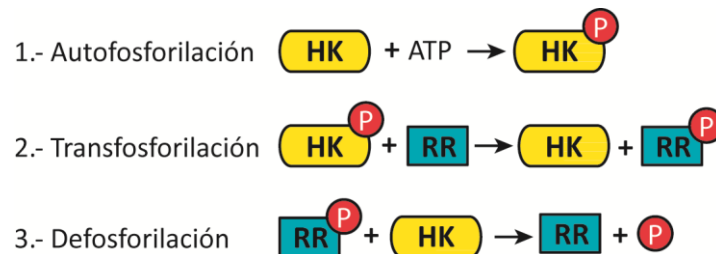


Figura 1. Esquema de las reacciones de transferencia del grupo fosfato en los sistemas reguladores de dos componentes (TCS) clásicos. La detección de la señal por el dominio sensor de la histidina quinasa (HK) genera una cascada de reacciones que comienzan con la transferencia del grupo fosfato (P) en posición γ del ATP a la His conservada del dominio catalítico de la HK (autofosforilación). Posteriormente, la HK cataliza la transferencia del grupo fosfato de la His al residuo de Asp conservado presente en el componente regulador de respuesta (RR) (transfosforilación). Finalmente, el grupo fosfato es transferido desde el Asp fosforilado al agua en una reacción de hidrólisis que está catalizada por el propio RR y/o la HK correspondiente (defosforilación). Las tres reacciones requieren la presencia de iones metálicos divalentes, siendo el Mg^{2+} el catión relevante *in vivo*.

2.3. Histidina quinasa sensoras (HKs).

Las HK son proteínas implicadas en detectar diferentes estímulos ambientales mediante su capacidad de autofosforilarse, y generar una respuesta celular mediante su capacidad para transferir la señal al correspondiente RR. Las HKs tienen una arquitectura modular con dos regiones funcionales y estructurales diferenciadas: una región variable sensora, generalmente extracelular y localizada en el extremo N-terminal de la proteína, responsable de percibir la señal o estímulo, y una región conservada catalítica citoplasmática, y generalmente localizada en el extremo C-terminal de la proteína, responsable de las reacciones de fosforilación (Fig. 2) (Laub y cols., 2007; Krell y cols., 2010; Capra y Laub, 2012).

El dominio sensor de la región N-terminal de las HK varía mucho en tamaño, secuencia, composición y disposición (Mascher y cols., 2006). Esta diversidad probablemente refleja el amplio espectro de estímulos ambientales que activan respuestas reguladoras específicas en las bacterias. Un tipo de motivo sensor muy frecuente son los motivos PAS (*Per-ARNT-Sim*) asociados con interacciones proteína-

proteína y con la unión a un amplio rango de ligandos en muchas proteínas, más de la mitad de estas proteínas son HKs (Taylor y Zhulin, 1999; Mascher y cols., 2006; Krell y cols., 2010; Henry y Crosson, 2011). Muchas HKs contienen un dominio HAMP (Inouye, 2006), localizado inmediatamente tras la región transmembrana, que actúa como región conectora con la región C-terminal citoplasmática. Otros dominios sensores frecuentes en HKs son PAC, GAF, CACHE y CHASE, el dominio Reg_prop, y otros como MHYT, MASE o 7TMR-DISM (Mascher y cols., 2006; Cheung y Hendrickson, 2011). Los dominios sensores de las HKs se pueden encontrar solos, en múltiples copias, en *tándem* o combinados entre ellos, lo que sugiere que éstas pueden estar implicadas en el reconocimiento de más de una señal y refleja la complejidad de la percepción de señales en bacterias (Galperin, 2001; Mascher y cols., 2006; Gao y Stock, 2009).

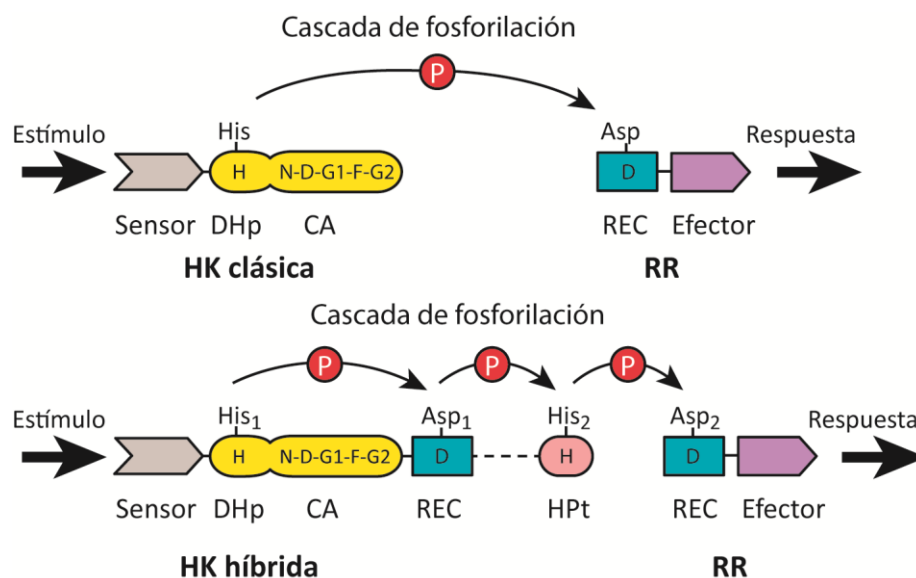


Figura 2. Esquema de la cascada de fosforilación entre distintos tipos de HKs y el correspondiente RR. La llegada de una señal al dominio sensor provoca la autofosforilación de la HK y la posterior transferencia del grupo fosfato al RR, el cual controla diversos procesos celulares. DHp: dominio de dimerización que incluye la His que se fosforila; CA: dominio catalítico que incluye los residuos catalíticos y estructurales conservados N, D, G1, F y G2; HPt: Histidina fosfotransferasa; REC: dominio *receiver*. En algunas HK híbridas, el dominio HPt se sustituye por un segundo dominio AK (DHp-CA).

La región C-terminal catalítica (dominio AK) está formada por dos dominios: un dominio de dimerización y de transferencia del grupo fosfato (DHp; *Dimerization Histidine phosphotransfer*), que permite que las HKs se estructuren como homodímeros y que incluye, en la parte central de la caja H, al residuo His aceptor del

grupo fosfato, y un dominio catalítico que une el ATP/Mg²⁺ (CA; *Catalytic ATP-binding*) y que contiene grupos de residuos altamente conservados, denominados cajas N, D, G1, F y G2, que juegan un papel importante en la unión del ligando y en la catálisis y/o la estructura (Stock y cols., 1989; Galperin, 2001; Gao y Stock, 2009) (Fig. 2). La caja N está implicada en la unión del ión de Mg²⁺ necesario para la catálisis; la caja D interacciona con el anillo de adenina del ATP; la caja G1 actúa como bisagra de la tapadera del sitio de reconocimiento del ATP, confiriéndole flexibilidad; la caja G2, permite mantener la integridad estructural del sitio de unión del ATP; y la caja F afianza la base del *loop* que constituye la tapadera del sitio de unión del ATP (Gao y Stock, 2009).

La superfamilia de HKs se ha clasificado en base a su módulo catalítico intracelular altamente conservado. La clasificación más detallada agrupa las HKs en once subfamilias en base a las cajas H-, N-, D-, F- y G (Grebe y Stock, 1999). Sin embargo, esta clasificación no tiene en cuenta aspectos funcionales del proceso de transducción de la señal. Por ello, Mascher y cols. publicaron posteriormente una clasificación de las HKs basada no solamente en alineamiento de secuencias sino también en la función y la identificación del dominio periplásmico, las hélices transmembrana (TM), y la predicción de su disposición topológica (Mascher y cols., 2006). Atendiendo a estos criterios, las HKs pueden clasificarse en tres grupos según la arquitectura de su dominio sensor: el grupo mayoritario de HKs contienen un dominio sensor periplásmico o extracelular con al menos dos hélices TM, e.g., EnvZ (Mizuno y cols., 1982); HKs con mecanismos sensores asociados a hélices (de 2 a 20) TM densamente empaquetadas en la membrana, e.g., FixL (de Philip y cols., 1990); y HKs citoplasmáticas solubles o ancladas a la membrana con dominio sensor en el citoplasma, e.g., CheA o NtrB (Armstrong y Adler, 1969; McFarland y cols., 1981).

Asimismo, y atendiendo a la mayor complejidad de los dominios estructurales y funcionales presentes, las HKs se pueden clasificar en clásicas u ortodoxas e híbridas (Gao y Stock, 2009). Mientras que las HKs clásicas tienen un dominio sensor y un dominio AK, las HKs híbridas contienen varios dominios donadores (módulo AK) y/o receptores (*receiver*, REC) de grupos fosfato, y utilizan una cascada de fosforilación (*phosphorelay*) que implica a His1 (módulo autoquinasa)-Asp1 (dominio REC)-His2 (localizada en el dominio HPT de transferencia de grupo fosfato o en un segundo

módulo AK; ambos transfieren el fosfato al residuo Asp2 del regulador de respuesta) (Fig. 2). Como ejemplo de HK híbrida con dominio HPt, podemos citar a ArcB de *E. coli* (Ishige y cols., 1994; Ikegami y cols., 2001) y como ejemplo de HK híbrida con un segundo módulo autoquinasa podemos citar a TodS de *P. putida* (Lau y cols., 1997; Lacal y cols., 2006). Generalmente, las HKs híbridas poseen varios dominios sensores que reconocen distintos tipos de estímulos. Se ha sugerido que la mayor complejidad de las HKs híbridas respecto de las HKs clásicas podría ser el resultado de la necesidad de integrar en una misma ruta de regulación las señales positivas y negativas del sistema (Djordjevic y Stock, 1998).

2.4. Reguladores de respuesta (RRs).

Los RRs constituyen el segundo elemento de los TCS, se activan por fosforilación y son responsables de la respuesta final del sistema. Los RRs suelen contener dos dominios funcionales: un dominio aceptor o *receiver* (REC) que es una unidad estructural compacta con un plegamiento autónomo altamente conservado, y un dominio efector variable (Laub y cols., 2007; Gao y Stock, 2009; Krell y cols., 2010; Capra y Laub, 2012) (Fig. 2).

El dominio aceptor (REC) contiene un residuo Asp conservado que recibe el grupo fosfato desde la HK. La fosforilación del dominio REC permite regular el dominio efector C-terminal de los RR. El dominio REC también puede presentar actividad de autodesfosforilación (Gao y Stock, 2009). De forma mayoritaria, los dominios efectores son dominios de unión a DNA por lo que activan o reprimen la transcripción de genes específicos. El mecanismo de regulación y la disposición en la unión al DNA, así como las secuencias de DNA que reconocen, difieren de un RR a otro. Otros RR presentan dominios efectores con actividad enzimática o con capacidad de unión a RNA o a proteínas, por lo que están implicados en procesos de control a nivel post-transcripcional (Gao y cols., 2007; Galperin, 2010).

La clasificación de los RRs se realiza principalmente según la arquitectura del dominio efector variable (Gao y cols., 2007; Galperin, 2006, 2010). Así, podemos diferenciar un primer grupo de RR, e.g., CheY (Stock y cols., 1985), con un dominio aceptor autónomo que no contienen dominio efector y que representan un 18% del total de RRs. Otro grupo de RRs contienen un dominio efector de unión a DNA

mayoritariamente del tipo HTH similar a NarL o del tipo HTH alada similar a OmpR, y representan el 64% de los RRs (Stewart, 1982; Mizuno y cols., 1982). Un último grupo de RRs, que representan un 18% del total, son aquellos que contienen otros dominios efectores que no unen DNA tales como dominios enzimáticos (13.5%) mayoritariamente metilesterasa, diguanilato ciclasas (GGDEF), o fosfodiesterasas de di-GMPc (EAL y HD-GYP); dominios de unión a proteínas (3%) o dominios de unión a RNA (1%) (Galperin, 2010).

2.5. Evolución de los TCSs.

Todas las evidencias apuntan a que los sistemas reguladores de un componente (OCSs, *One Component Systems*), son precursores evolutivos de los TCSs. Los OCSs presentan un diseño modular mucho más simple que los TCSs, con un dominio sensor fusionado a un dominio efector pero sin el módulo autoquinasa y el dominio aceptor de fosfato presentes en los TCSs. El repertorio de dominios de los reguladores OCS es considerablemente más diverso que el de los reguladores del tipo TCS, y además estos sistemas están más ampliamente distribuidos entre organismos procariotas, mientras que los TCSs están ausentes en algunas especies, particularmente entre arqueas. Así, una de las hipótesis que se maneja actualmente es que los TCSs aparecieron como resultado de la inserción de dominios HK y REC en sistemas reguladores de un componente seguido de una diferenciación en dos proteínas individuales (Ulrich y cols., 2005; Krell y cols., 2009; Wuichet y cols., 2010).

La diferencia fundamental entre los OCSs y los TCSs reside en la detección y transmisión del estímulo. En los OCSs, la detección es mayoritariamente intracelular, produciéndose en el citosol en el 97 % de los casos y conlleva una respuesta independiente de cascadas de fosforilación (al carecer de los dominios implicados en la auto/transfosforilación), mientras que en los TCS la detección es mayoritariamente extracelular, ya que en un 73 % de los casos el dominio sensor de la HK está asociado a la membrana, e implica una cascada de fosforilación (Ulrich y cols., 2005).

Por tanto, los TCSs podrían ser una innovación bacteriana para regular el metabolismo celular en función de señales extracitoplasmáticas. Los TCSs clásicos (CTCSs) han evolucionado y se han diversificado para expandir el repertorio y aumentar su capacidad de responder a múltiples señales (Capra y Laub, 2012).

Además, han surgido modificaciones a los CTCs como son la aparición de HKs híbridas o los recientemente descritos sistemas reguladores de dos componentes híbridos (HTCS, *Hybrid Two Component Systems*), que poseen una arquitectura novedosa donde el componente HK está fusionado al componente RR formando una única proteína (Sonnenburg y cols., 2006).

3. Sistemas reguladores de dos componentes híbridos (HTCSs).

Los HTCSs son sistemas de transducción de señales que incorporan los dos componentes presentes en los CTCs, i.e., HK y RR, fusionados en un único polipéptido (Sonnenburg y cols., 2006).

Los HTCSs se identificaron por primera vez en la bacteria *Porphyromonas gingivalis* (Hasegawa y cols., 2003), aunque se describieron y estudiaron en la bacteria *Bacteroides thetaiotamicron* (*B. thetaiotamicron*) del mismo grupo, Bacteroidetes, años después (Sonnenburg y cols., 2006, 2010; Townsend y cols., 2013). Esta bacteria, miembro prominente de la comunidad microbiana intestinal humana, se caracteriza por su capacidad para degradar una amplia variedad de polisacáridos empleando su extensa maquinaria sacarolítica controlada por un amplio repertorio de reguladores (Sonnenburg y cols., 2006; Ravcheev y cols., 2013). En el genoma de *B. thetaiotamicron* se ha identificado una numerosa colección de genes implicados en detectar cambios ambientales, que incluye 54 HKs, 29 RRs que forman parte de CTCs, así como 32 HTCSs, todos ellos implicados en la regulación del metabolismo de carbohidratos (Sonnenburg y cols., 2006, 2010; Lowe y cols., 2012; Ravcheev y cols., 2013).

Desde su identificación inicial en el genoma de *P. gingivalis*, se han identificado miembros de la familia HTCS en otros Bacteroidetes, Proteobacterias, y Chloroflexi (Sonnenburg, 2006). Algunos ejemplos de esta familia son las proteínas BT3172 de *B. thetaiotaomicron* implicada en la regulación de los genes responsables de la degradación de manósidos (Sonnenburg y cols., 2006), GppX de *P. gingivalis* implicada en la maduración y localización de proteasas (Hasegawa y cols., 2003; Hirano y cols., 2012) o la proteína TF0022 de *Tannerella forsythia* implicada en la expresión del *cluster* de genes relacionados con glicosilación, modificación post-traduccional y autoagregación (Niwa y cols., 2011).

El HTCS prototípico, ejemplificado por cualquiera de los 32 HTCS presentes en *B.*

thetaitomicron, consiste en una región N-terminal constituida por un dominio sensor periplásmico de unión a ligando poco conservado, seguido por hasta cinco segmentos transmembrana, unido a tres dominios citoplasmáticos conservados: un dominio AK, un dominio aceptor de grupo fosforilo REC y un dominio efector de respuesta, regulador transcripcional (de la clase HTH_AraC) (Fig. 3).

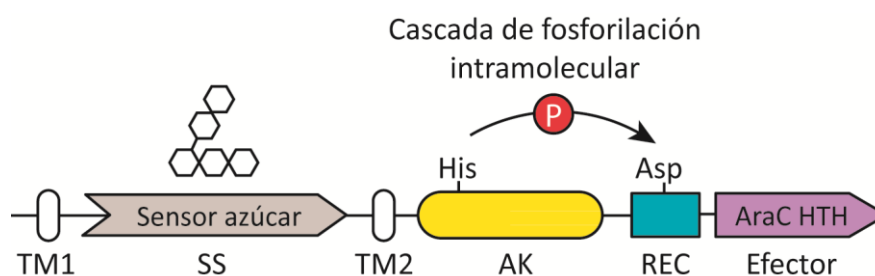


Figura 3. Esquema de los HTCS descritos en Bacteroidetes. En los HTCSs, la HK y el RR están fusionados en un único polipéptido, por tanto, la transferencia de fosfato ocurre en la misma molécula. En *B. thetaiotamicron* los HTCSs se localizan en membrana y presentan los siguientes dominios: SS: dominio sensor de azúcares; TM: dominio transmembrana; AK: dominio autoquinasa; REC: dominio *receiver*; AraC-HTH: dominio efector de unión a DNA.

El dominio sensor de los HTCSs está menos conservado entre los miembros de esta familia que sus dominios de señalización intracelular, lo que sugiere que estas proteínas se han diversificado para responder a distintas señales pero conservan el mecanismo de transducción de la señal dentro de la célula, típico de los TCSs. Aunque los componentes HK y RR presenten una similitud significativa con los de los CTCs, posiblemente las reglas que rigen la transducción de la señal en los CTCs no sean del todo aplicables a los HTCSs (Gao y Stock, 2009; Capra y cols., 2010; Casino y cols., 2010; Raghavan y Groisman, 2010; Townsend y cols., 2012). Poco se sabe sobre la aparición y las ventajas de los HTCSs frente a CTCs, aunque se manejan una serie de hipótesis. (Whitworth y Cock, 2009). Por un lado, la aparición de estos sistemas multifuncionales impone una serie de restricciones, pues fuerzan a los HTCSs a una sola localización celular o compartimentalización. Por otro lado, la fusión de los dos componentes reducirá la difusión y facilitará la formación del complejo HK:RR, un paso limitante en los sistemas de transducción de señales. Así, mientras que en los CTCs suele haber un exceso del número de moléculas de RR sobre el número de moléculas de la HK (en el caso de PhoQ:PhoP se ha descrito que es de 1:50) en los HTCSs el ratio

es 1 (asumiendo que no hay separación proteolítica o degradación diferencial de uno de los componentes) (Raghavan y Groisman, 2010). Además, en los HTCSs se evita la interacción inespecífica (*cross-talk*) entre HK y RR, ya que se favorece la transferencia de fosfato intramolecular frente a las interacciones intermoleculares de la HK con otros RR. Dado que generalmente la propia HK es la responsable de la defosforilación del RR, la fusión de los dos componentes en los HTCSs podría facilitar una rápida defosforilación, lo que supone una ventaja cuando se necesita una rápida inactivación del sistema (Lynch y cols., 2012). De esta forma, los HTCSs exhibirían una mayor eficiencia y rapidez en la transducción de la señal que los CTCs (Cock y Whitworth, 2007; Whitworth y Cock, 2009; Raghavan y Groisman, 2010; Townsend y cols., 2012). Finalmente, presentar los dos componentes unidos en HTCSs facilita la duplicación o eventos de transferencia lateral sin que se necesite una constante co-evolución que impida perder los residuos determinantes de especificidad tan importantes para evitar la interacción cruzada inespecífica (Townsend y cols., 2012).

En este sentido, los HTCSs podrían ser considerados un paso en la evolución de los CTCs hacia los OCSs, conservando el mecanismo de transferencia de fosfato, lo que proporcionaría oportunidades adicionales para la modulación de la transducción de señales por quinasas y fosfatasas externas permitiendo una mejor regulación y adaptación a una situación ambiental dada (Cock y Whitworth, 2007).

4. El segundo mensajero celular di-GMPc.

El (3'→5') di-GMP cíclico (di-GMPc) es una pequeña molécula descrita por primera vez por el grupo de Benziman en 1987 como un activador alostérico de la enzima celulosa sintasa en la bacteria *Gluconacetobacter xylinus* (Ross y cols., 1987). Desde entonces el di-GMPc ha emergido como un segundo mensajero central y ubicuo o universal en procariotas que se ha demostrado implicado en orquestar el cambio de vida de muchas bacterias incluyendo la transición entre el estado planctónico móvil a un estado sésil que ayuda en el establecimiento de comunidades multicelulares (biopelículas), y desde el estado virulento en infecciones agudas a un estado menos virulento característico de enfermedades crónicas (Krasteva y cols., 2012; Römling y cols., 2013).

Poco después del descubrimiento del di-GMPc, el mismo grupo identificó y

secuenció los genes que codificaban las enzimas responsables de su síntesis, diguanilato ciclasa (*Diguanylate cyclase*, DGC), y su ruptura, fosfodiesterasa (*Phosphodiesterase*, PDE) (Tal y cols., 1998). El análisis del gran número de genomas secuenciados ha revelado que frecuentemente las proteínas que contienen uno o los dos dominios DGC y/o PDE aparecen, directa o indirectamente, ligadas a un dominio sensor (PAS, GAF, etc.) en sistemas reguladores TCS, lo que implica que numerosas señales pueden ser integradas en la red del di-GMPc (Ryan y cols., 2006; Schirmer y Jenal, 2009; Römling y cols., 2013; Ryan, 2013).

Desde un punto de vista práctico, la modulación de las vías de señalización de di-GMPc en bacterias podría representar una nueva forma de controlar la formación y dispersión de las biopelículas en escenarios tanto médicos como industriales. Asimismo, estudios recientes han puesto de manifiesto que el di-GMPc es un efectivo inmunomodulador pues es reconocido por el sistema inmune de mamíferos como una molécula específica de bacterias, y por tanto, se considera un prometedor adyuvante de vacunas (Karaolis y cols., 2007; Krasteva y cols., 2012).

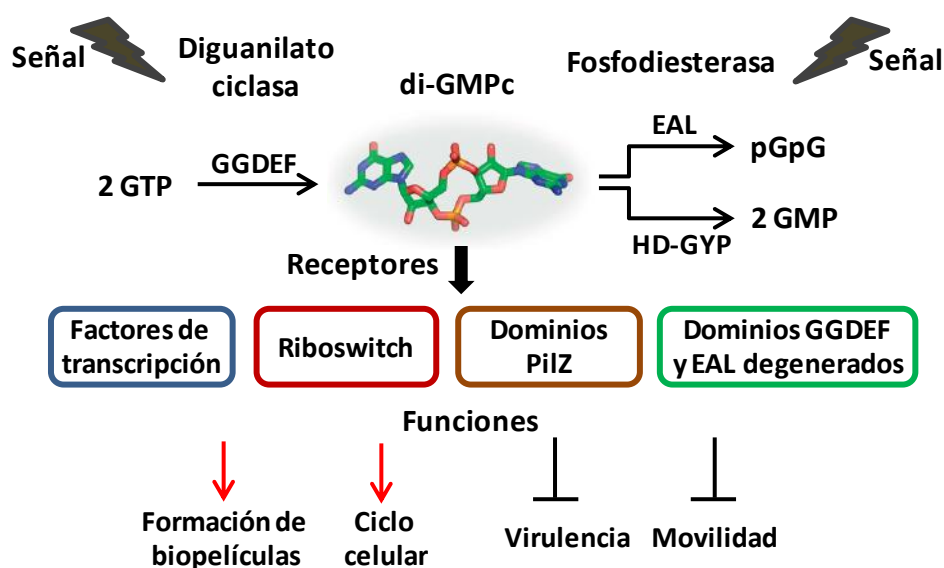


Figura 4. Diagrama de la síntesis y degradación de di-GMPc, su mecanismo de acción y sus funciones. El di-GMPc se sintetiza por DGC que contienen el motivo GGDEF, y se degrada por PDE que contienen los motivos EAL o HD-GYP. Estas actividades están moduladas por distintas señales ambientales. El di-GMPc es detectado por proteínas receptoras (factores de transcripción, proteínas con dominios PilZ, proteínas con motivos GGDEF y EAL degenerados o DGCs con *I-site*) o RNAs (riboswitch) que interaccionan con su diana, alterando una función celular particular. Un aumento en los niveles de di-GMPc conlleva un aumento en la formación de biopelículas y/o progresión en el ciclo celular (flechas rojas), y una disminución en la movilidad y/o virulencia (líneas negras).

4.1. Metabolismo del di-GMPc.

La síntesis de di-GMPc a partir de dos moléculas de GTP está catalizada por el dominio DGC (Fig. 4). Aunque la identidad en secuencia primaria de estos dominios DGC suele ser baja, todos presentan el motivo GGDEF altamente conservado, y su estructura secundaria y terciaria también suele presentar un elevado grado de conservación. Los dominios DGC generalmente forman parte de una proteína de mayor tamaño que contiene dominios y motivos accesorios que regulan la síntesis de di-GMPc (Ross y cols., 1987; Römling y cols., 2005, 2013; Schirmer y Jenal, 2009).

La cristalización de la sintasa PleD de *Caulobacter crescentus* permitió ahondar en el conocimiento sobre las conformaciones activa e inactiva de DGC, así como en el mecanismo catalítico de estas enzimas (Chan y cols., 2004; Wassmann y cols., 2007). Los dominios DGC funcionan como homodímeros donde el sitio activo (*A-site*), localizado en la interfase del dímero, está implicado en la unión de GTP y en la catálisis. Los dos primeros residuos (G) del motivo GGDEF están implicados en la unión del GTP, el tercero (D/E) es indispensable para la catálisis y el cuarto (E) está implicado en la coordinación con iones metálicos Mg^{2+}/Mn^{2+} necesarios para la formación del enlace fosfoéster. Asimismo, se identificó un mecanismo que afectaba la activación/inactivación de las DGCs y que implicaba inhibición por retroalimentación. De esta forma se definió un segundo sitio, el sitio de inhibición (*I-site*), constituido por cuatro residuos aminoácidos generando el motivo RxxD, donde “x” es cualquier residuo, y que aparece cinco aminoácidos aguas arriba del motivo GG(D/E)EF. Este segundo motivo se encuentra en aproximadamente la mitad de los dominios DGC (Römling y cols., 2013) y contribuye a limitar el tiempo de la activación, evitando la acumulación indeseada de elevados niveles de di-GMPc. El principal mecanismo implicado en la activación de las DGC es el que regula el cambio conformacional que se tiene que producir para que interaccionen los dos monómeros de DGC. Este cambio conformacional se produce en respuesta a cambios en los dominios sensores (PAS, etc.) o receptores de señal (REC), activados por señales ambientales, que están unidos al dominio DGC (Wassmann y cols., 2007).

Por otro lado, la degradación del di-GMPc está catalizada por el dominio fosfodiesterasa (PDE) a través de los motivos EAL, genera el dinucleótido lineal 5'-fosfoguanilil-(3'→5')-guanosina (5'-pGpG), o HD-GYP, genera 2 moléculas de GMP (Fig.

4). A continuación, todo lo comentado se referirá a las proteínas PDE con motivo EAL, que es el más abundante y mejor caracterizado (Römling y cols, 2013).

Las PDE que contienen motivos EAL son altamente específicas de sustrato, presentando unas constantes de afinidad en el rango de micromolar, lo que es consistente con la baja concentración de di-GMPc celular (μM). Esta actividad requiere de iones metálicos $\text{Mg}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$, y se encuentra altamente inhibida por Ca^{2+} (Christen y cols., 2005; Schmidt y cols., 2005).

A diferencia de las DGCs, algunas PDEs mantienen parte de su actividad como monómeros, sin embargo la gran mayoría necesita oligomerizar, y la dimerización parece clave en la activación de PDEs por estímulos ambientales (Wassmann y cols., 2007; Schirmer y Jenal, 2009; Römling y cols., 2013; Sundriyal y cols., 2014).

La cristalización de la proteína BlrP1 de *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), un OCS cuya actividad PDE se ve activada por la luz azul, permitió obtener mucha información sobre el mecanismo catalítico, dependencia del pH y los cationes así como de los mecanismos de activación por estímulos ambientales (Barends y cols., 2009). Las PDEs emplean generalmente un mecanismo catalítico basado en dos metales, es decir, unen di-GMPc a través de dos cationes, los cuales coordinan dos moléculas de agua necesarias para la hidrólisis del enlace fosfoéster. Asimismo, un alto pH y Mn^{2+} promueven longitudes de enlaces óptimos, mientras que el Ca^{2+} distorsiona estas distancias, explicando su fuerte efecto inhibitorio. Por otro lado, trabajos de mutagénesis dirigida demuestran que los aminoácidos EAL conservados están implicados en la unión al di-GMPc y en la catálisis, y se sabe que el residuo Glu está directamente implicado en la unión de uno de los metales, lo que explica su elevada conservación en todas las enzimas PDE activas (Tchigvintsev y cols., 2010).

4.2. Proteínas que contienen tanto dominios DGC como PDE.

Análisis genómicos revelan que en muchas ocasiones los dominios DGC y PDE aparecen en el mismo polipéptido como parte de proteínas multidominio. Esto ocurre con aproximadamente un tercio de los dominios DGCs y dos tercios de los PDEs analizados. En raras ocasiones puede tratarse de enzimas bifuncionales en las que los dos dominios sean enzimáticamente activos y se regulen por distintas señales internas o externas de forma que en un momento dado una actividad sea predominante sobre

la otra, e.g., la proteína de *Mycobacterium smegmatis* DcpA (Bharati y cols., 2012). Sin embargo, lo que ocurre con más frecuencia es que uno de los dominios (o a veces los dos dominios) es inactivo enzimáticamente y adquiere nuevas funciones, como la de regulador alostérico, o juega un papel a nivel estructural. Éste es el caso de la proteína CC3396 de *C. crescentus*, que presenta un motivo GGDEF degenerado pero capaz de unir GTP, lo que aumenta drásticamente la afinidad del dominio PDE por su sustrato, funcionando por tanto como un regulador alostérico (Christen y cols., 2005, 2006).

4.3. Tipos de receptores de di-GMPc.

Para ejercer su papel, el segundo mensajero di-GMPc debe unirse a una molécula efectora. Aunque se ha demostrado la actuación del di-GMPc tanto a nivel transcripcional, post-transcripcional y post-traducciona (Hickman y Harwood, 2008; Krasteva y cols., 2012; Sondermann y cols., 2012; Römling y cols., 2013), hasta la fecha se han descrito sólo algunos motivos que reconocen e interaccionan específicamente con este segundo mensajero celular (Fig. 4). Así, el dominio PilZ fue el primer tipo de receptor identificado, está presente en un gran número de bacterias y posee una alta afinidad por el di-GMPc en ensayos *in vitro* como se ha puesto de manifiesto en un buen número de proteínas tales como BcsA o YcgR de *E. coli* (Ryjenkov y cols., 2006), DgrA de *C. crescentus* (Christen y cols., 2007), FlgZ de *P. fluorescens* F113 (Martínez-Granero y cols., 2014) o PlzC y PlzD de *Vibrio cholerae* (Pratt y cols., 2007). El di-GMPc puede unirse a los dominios PilZ de diferentes maneras, y se han podido establecer dos motivos consenso, RxxxRx y (D/N)x(S/A)xxG. Otros receptores de di-GMPc son, el *I-site* de algunas DGC (ver más arriba) o las proteínas que poseen dominios GGDEF y EAL degenerados y que unen di-GMPc para inhibir alostéricamente su actividad, como por ejemplo las proteínas FimX, que gobierna el cambio a un estado móvil (Navarro y cols., 2009), PelD, que controla la producción de exopolisacárido, de *P. aeruginosa* (Lee y cols., 2007) o FilP, que controla los genes de virulencia en *Xanthomonas oryzae* (Yang y cols., 2014). En los últimos años se han incluido como receptores de di-GMPc algunos miembros de la familia de reguladores de transcripción, como el regulador transcripcional FleQ perteneciente a la familia NtrC/DctD que controla la expresión de los genes de biosíntesis de exopolisacárido y adhesinas, o BrlR de la familia MerR que controla la expresión de bombas de extrusión, ambas en *P. aeruginosa* (Hickman y

Harwood, 2008; Chambers y cols., 2014), o el activador transcripcional de la familia CRP/FNR descrito en *Xanthomonas* (Clp) y *Burkholderia* (Bcam1349) (Leduc y Roberts, 2009; Chin y cols., 2010). Además de los motivos proteicos de reconocimiento de di-GMPc se han identificado dos tipos de “*riboswitch*” con capacidad de unir di-GMPc y que controlan la expresión de algunos mRNA que codifican proteínas DGC/EAL o proteínas implicadas en virulencia, biosíntesis de flagelos y pili, etc (Sudarsan y cols., 2008; Navarro y cols., 2011; Luo y cols., 2014). La detección de nuevos receptores y dianas regulados por di-GMPc deberá ser abordado en profundidad en los próximos años, ya que indudablemente habrá muchos más de los identificados hasta el momento.

4.4. Fenotipos regulados por el di-GMPc.

La enorme diversidad de proteínas con motivos DGC o PDE que se encuentran codificadas en los genomas bacterianos, así como la variedad de receptores que responden a di-GMPc, sugieren que los procesos celulares controlados por este segundo mensajero puedan ser muy diferentes y de gran importancia en la célula, como de hecho confirman las alteraciones observadas en los fenotipos de los mutantes descritos hasta la fecha (Fig. 4) (Römling y cols., 2013). Así, podemos citar la implicación del di-GMPc en la biosíntesis de adhesinas y exopolisacáridos, movilidad, respuesta a estrés y supervivencia a largo plazo, síntesis de metabolitos secundarios, control de proteólisis y progresión de ciclo celular o en la virulencia bacteriana (Schirmer y Jenal, 2009; Ryan, 2013). En términos generales, niveles elevados de di-GMPc en la célula promueven la formación de exopolisacáridos (EPS) (Lee y cols., 2007; Bobrov y cols., 2008) y biopelículas (Hickman y cols., 2005; Kuchma y cols., 2007), confieren morfología de colonia rugosa (Simm y cols., 2004; Lim y cols., 2006; Güvener y Harwood, 2007), e inhiben la movilidad celular (Kazmierczak y cols., 2006; Kim y McCarter, 2007) y la virulencia (Tischler y Camilli, 2005; Ryan y cols., 2006; Ryan, 2013). El di-GMPc regula, por tanto, la reprogramación de la expresión genética cuando la bacteria cambia de un estilo de vida planctónico (móvil) a otro que supone la formación de biopelículas (sésil) (Simm y cols., 2004; Römling y Amikam, 2006).

Tras más de 25 años de estudio de este segundo mensajero bacteriano incluido en el grupo de las alarmonas todavía queda mucho por descubrir. Así, tan sólo han sido

descritos unos pocos circuitos de señalización por di-GMPc completos (Römling y cols., 2013). De la mayoría de ellos, se conocen componentes aislados, enzimas o receptores implicados, pero no el mecanismo molecular de regulación o las señales que afectan a estos circuitos de regulación, ni las implicaciones que pueda tener la distinta distribución espacio-temporal o los gradientes de concentración de di-GMPc en la célula, o la flexibilidad conformacional de la propia molécula de di-GMPc (Römling y cols., 2009, 2013; Krasteva y cols., 2012). Además, no se puede olvidar su interconexión con otros sistemas de regulación que implican a otros segundos mensajeros nucleotídicos como di-AMPc, GMPc, AMPc, ppGpp y Ap4A, u otros reguladores globales, así como los mecanismos de *quorum sensing*, los cuales controlan también varios procesos clave en la respuesta bacteriana a la adaptación a nuevos ambientes y estilos de vida (Galperin, 2004; Camilli y Bassler, 2006; Pesavento y Hengge, 2009; Kalia y cols., 2013).

5. TolR es un sistema regulador de dos componentes híbrido (HTCS) de *Azoarcus* sp. CIB.

Como se ha indicado en el apartado 1 de esta Introducción, la biodegradación bacteriana de compuestos aromáticos requiere que las células ajusten sus programas para hacer frente a la situación de estrés que generan dichos compuestos por su toxicidad intrínseca y a la respuesta metabólica necesaria para su mineralización (Ramos y cols., 2002; Jiménez y cols., 2010). El ajuste de dichos programas celulares implica a toda una compleja red de sistemas de detección y transducción de señales las cuales, a su vez, están acoplados a las redes de regulación global de la célula y a la regulación específica de cada una de las rutas metabólicas involucradas (Díaz y cols. 2013). Como también se comentó anteriormente, nuestro grupo ha identificado y caracterizado varios de los sistemas de regulación que controlan el catabolismo anaeróbico de los compuestos aromáticos en *Azoarcus* sp. CIB (Durante-Rodríguez y cols., 2006, 2008, 2010; Blázquez, 2009; Valderrama y cols., 2012, 2014; Juárez y cols., 2013). Entre los estudios previos del grupo, cabe destacar aquí la caracterización de los genes *bbs-bss* responsables de la ruta periférica de degradación anaeróbica de tolueno y *m*-xileno, con la formación de los intermediarios centrales benzoil-CoA y 3-metilbenzoil-CoA, respectivamente, en *Azoarcus* sp. CIB (Blázquez, 2009; Carmona y

cols., 2009). El análisis detallado del *cluster bbs-bss* (número de acceso: DQ988527), reveló la presencia de un gen presuntamente regulador y localizado entre los operones *bbs* y *bss*, en posición 3' al último gen del operón *bbs* (*bbsI*), que no tiene homólogos en los *clusters bbs-bss* de otros organismos, y que se denominó *tolR* (Blázquez, 2009). Dicho gen codifica la proteína TolR (1049 aa; 115 KDa) que presenta una arquitectura modular compleja y peculiar (Fig. 5) y cuya función es desconocida hasta la fecha. La inactivación del gen *tolR* no impide el crecimiento anaeróbico de la cepa *Azoarcus* sp. CIB*dtolR* en tolueno/*m*-xileno, aunque lo ralentiza un poco, por lo que no parece estar implicado directamente en la ruta catabólica de degradación de tolueno/*m*-xileno. Por el contrario, estudios preliminares revelaron que el mutante *Azoarcus* sp. CIB*dtolR* mostraba una disminución significativa en su respuesta quimiotáctica frente a tolueno respecto a la mostrada por la cepa parental CIB (Blázquez, 2009).

El análisis de la estructura primaria de TolR reveló un supradominio N-terminal que posee un dominio sensor PAS, seguido de un dominio autoquinasa (AK), y un supradominio C-terminal compuesto por un dominio *receiver* (REC), y por dominios diguanilato ciclasa (DGC) y fosfodiesterasa (PDE) implicados en la síntesis y degradación, respectivamente, del di-GMPc (Fig. 5).

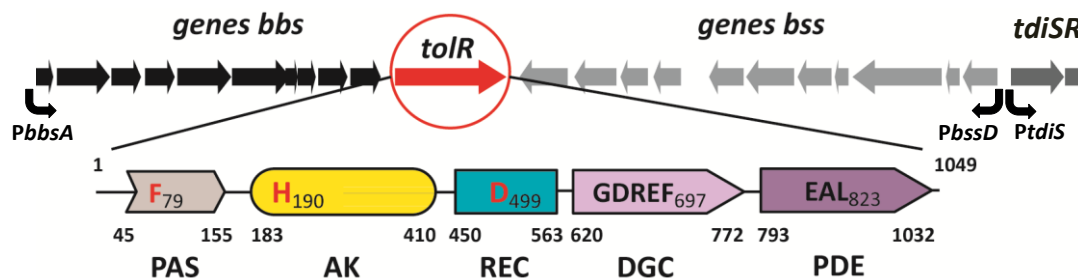


Fig. 5. Localización del gen *tolR* en el *cluster bbs-bss* de *Azoarcus* sp. CIB y esquema de la arquitectura modular de la proteína TolR. El gen *tolR* (flecha roja) está localizado entre los operones convergentes *bbs* (flechas negras) y *bss* (flechas grises) y se co-transcribe con los genes *bbs*. Los genes *tdiSR* codifican un TCS que controla la expresión de los genes *bbs-bss*. En el esquema de la proteína TolR se indica la localización de los dominios PAS (sensor), AK (autoquinasa), REC (*receiver*), DGC (diguamilato ciclasa) y PDE (fosfodiesterasa), así como la posición de los aminoácidos clave de cada dominio (se indica la posición del primer aminoácido). Los residuos de His y Asp implicados en la transferencia del grupo fosfato se señalan en rojo.

La región N-terminal (dominios PAS, AK) y el dominio REC de TolR muestran similitud significativa con los correspondientes dominios de HK híbridas sensoras de

hidrocarburos aromáticos tales como StyS (51 % de identidad), TutC (54 % de identidad) y TodS (47 % de identidad) que regulan la degradación aeróbica de estireno en *Pseudomonas* (Velasco y cols., 1998), el catabolismo aeróbico de tolueno en *Thauera aromatica* T1 (Coschigano y Young, 1997) y el catabolismo aeróbico de tolueno en *Pseudomonas putida* (Lau y cols., 1997; Mosqueda y cols., 1999) respectivamente. Estos análisis sugieren, por lo tanto, que TolR podría estar detectando hidrocarburos aromáticos y respondiendo a éstos mediante una cascada de fosforilación.

Los dominios DGC y PDE de TolR muestran alta identidad de secuencia (aproximadamente 50-60% de identidad) con dominios equivalentes de reguladores de respuesta codificados en el genoma de otros *Azoarcus* tales como las cepas KH32C BH72 y EbN1, así como con presuntas PDE de cepas de *Burkholderia* (44% de identidad). Mientras que el dominio PDE de la proteína TolR está perfectamente conservado en su motivo catalítico EAL, el dominio DGC posee un motivo catalítico (GDREF) que difiere en varias posiciones de la secuencia consenso GGDEF, lo que sugiere que si bien TolR podría hidrolizar di-GMPc, la actividad de síntesis de di-GMPc estará ausente en esta proteína (Blázquez, 2009).

La estructura de la proteína TolR se corresponde, por tanto, con la de un nuevo miembro de los sistemas reguladores de dos componentes híbridos (HTCSs), donde el componente Histidina quinasa sensor, y el componente regulador de respuesta, aparecen fusionados en un único polipéptido (Fig. 5). La proteína TolR representaría, además, el primer HTCS que responde a hidrocarburos aromáticos y cuyo mecanismo de acción no implicaría una interacción directa con el DNA diana sino una actividad enzimática que modula los niveles del segundo mensajero celular di-GMPc. Por todo ello, en esta tesis se ha procedido al estudio y caracterización de la proteína TolR y su mecanismo de acción, así como a la identificación inicial de sus posibles dianas celulares y su papel en la fisiología de *Azoarcus* sp. CIB.

III. OBJETIVOS

Como se ha comentado en la Introducción, *Azoarcus* sp. CIB es un microorganismo modelo para el estudio del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos. La existencia de herramientas para su manipulación genética y la reciente secuenciación y anotación de su genoma facilitan la realización de estudios genéticos y bioquímicos en este microorganismo biodegradador. Por otro lado, la versatilidad metabólica de esta cepa que le permite degradar una gran variedad de compuestos aromáticos, muchos de ellos importantes tóxicos, presupone, además, la existencia de complejos mecanismos de regulación todavía desconocidos y que controlan tanto la utilización de dichos compuestos como fuente de carbono como la respuesta de estrés frente al efecto tóxico causado por dichos compuestos en la célula.

Al inicio de esta Tesis Doctoral se habían realizado algunos experimentos preliminares sobre el gen *tolR* que se localiza en el *cluster bss-bbs* responsable de la ruta periférica de degradación anaeróbica del tolueno y *m*-xileno en *Azoarcus* sp. CIB. La compleja arquitectura modular de la proteína TolR y su implicación en la quimiotaxis hacia tolueno, sugería que se trataba de un novedoso HTCS que regula los mecanismos de adaptación de *Azoarcus* sp. CIB al consumo de hidrocarburos aromáticos. No obstante, no se disponía de ninguna confirmación experimental sobre la actividad y mecanismo de acción de la proteína TolR, ni tampoco sobre los genes implicados en la respuesta celular mediada por dicha proteína. Por ello, en este trabajo de Tesis, se propuso profundizar en el estudio de la proteína TolR de *Azoarcus* sp. CIB. y se definieron los siguientes objetivos:

- **Objetivo 1:** Estudio del papel del gen *tolR* en la adaptación de *Azoarcus* sp. CIB a los hidrocarburos aromáticos.
- **Objetivo 2:** Caracterización del mecanismo de acción de la proteína TolR, un nuevo HTCS.
- **Objetivo 3:** Identificación de genes implicados en la cascada de señalización controlada por la proteína TolR en *Azoarcus* sp. CIB.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas bacterianas y plásmidos.

La Tabla 1 muestra las diferentes cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *Azoarcus* sp. CIB empleadas en este trabajo, junto con sus genotipos y características más relevantes.

Los plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la Tabla 2, donde se muestra el nombre de cada plásmido y sus características más relevantes.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

| Cepa | Genotipo/Fenotipo | Referencia |
|-------------------------|---|--------------------------|
| <i>E. coli</i> | | |
| DH10B | <i>F'</i> , <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>dlac</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 araD139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (<i>Sm</i>^R) <i>endA1 nupG</i></i> | Life Technologies |
| BL21 (DE3) | <i>F-ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])</i> | Novagen |
| TRMG | MG1655 <i>csrA::km</i> ^R | Romeo y cols., 1993 |
| ER 2566 | <i>F-λ-fhuA2 [lon] ompT lacZ::T7 gene 1 gal sulA11 Δ(mcrC-mrr)114::IS10 R(mcr-73::miniTn10-TetS)2 R(zgb-210::Tn10)(TetS) endA1 [dcm]</i> | New England Biolabs |
| <i>P. aeruginosa</i> | | |
| PAO1 Δ wspF | Δ wspF | Baraquet y cols., 2012 |
| PAO1pel | Δ pel Δ psl Δ wspF <i>PpelA::lacZ</i> | Baraquet y cols., 2012 |
| <i>Azoarcus</i> sp. CIB | | |
| CIB | Cepa silvestre degradadora de compuestos aromáticos | López-Barragán, 2004 |
| CIBdtolR | Km ^R , cepa CIB mutante por inserción en el gen <i>tolR</i> | Blázquez, 2009 |
| CIBT | Cepa CIB que carece del elemento genético móvil ICEXTD (isla metabólica que contiene las rutas de degradación anaeróbica de tolueno, <i>m</i> -xileno y 3-metilbenzoato) | Laboratorio Eduardo Díaz |

Tabla 2. Plásmidos empleados en este trabajo.

| Plásmido | Descripción | Referencia |
|--------------------------|---|---------------------|
| pET29a | Km ^R , <i>oriF1</i> , <i>oriColE1</i> , promotor T7, operador <i>lac</i> , C-terminal His ₆ | Novagen |
| pETtolR | Km ^R , derivado de pET29a que expresa la fusión génica <i>tolR</i> -His ₆ | Este trabajo |
| pETtolR ^{H190V} | Km ^R , derivado de pET29a que expresa la fusión génica <i>tolR</i> ^{H190V} -His ₆ | Este trabajo |
| pETtolR _{SK} | Km ^R , derivado de pET29a que expresa la fusión génica <i>tolR</i> _{SK} -His ₆ | Este trabajo |
| pTYB12 | Ap ^R , <i>oriM13</i> , <i>oriPBR322</i> , operador <i>lac</i> , N-terminal inteína | New England Biolabs |
| pTYBtolR _{RR} | Ap ^R , derivado de pTYB12 que expresa la fusión génica int- <i>tolR</i> _{RR} | Este trabajo |

| | | |
|--------------------------|--|-------------------|
| pIZ1016 | Gm ^R , derivado del vector de clonación y expresión de amplio espectro de huésped pBBR1MCS-5 con el promotor <i>Ptac</i> y el gen <i>lacI</i> ^Q de pMM40 | Moreno-Ruiz, 2003 |
| pIZtolR | Gm ^R , derivado de pIZ1016 que contiene el gen <i>tolR</i> bajo el control del promotor <i>Ptac</i> | Blázquez, 2009 |
| pIZ2133 | Gm ^R , derivado de pIZ1016 que contiene el gen <i>PA2133</i> de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 bajo el control del promotor <i>Ptac</i> | Este trabajo |
| pIZtolR ^{H190V} | Gm ^R , derivado de pIZ1016 que contiene el gen <i>tolR</i> ^{H190V} bajo el control del promotor <i>Ptac</i> | Este trabajo |
| pIZtolR ^{F79A} | Gm ^R , derivado de pIZ1016 que contiene el gen <i>tolR</i> ^{F79A} bajo el control del promotor <i>Ptac</i> | Este trabajo |
| pIZtolR _{SK-RR} | Gm ^R , derivado de pIZ1016 que contiene los genes <i>tolR_{SK}</i> y <i>tolR_{RR}</i> bajo el control del promotor <i>Ptac</i> | Este trabajo |
| pIZtolR _{RR} | Gm ^R , derivado de pIZ1016 que contiene el gen <i>tolR_{RR}</i> bajo el control del promotor <i>Ptac</i> | Este trabajo |

2. Medios y condiciones de cultivo.

Todas las soluciones y medios de cultivo utilizados en este trabajo se esterilizaron por calor húmedo en autoclave a 121 °C y 1 atmósfera de presión, o mediante filtración utilizando filtros estériles Millipore de 0,2 µm de tamaño de poro. Para los crecimientos de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *Azoarcus* sp. CIB se utilizaron diferentes medios de cultivo cuya composición se detalla a continuación.

2.1. Medios de cultivo empleados para *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

El medio rico empleado fue *Lysogeny Broth* (LB) (Sambrook y Rusell, 2001). Los cultivos de *E. coli* y *P. aeruginosa* en medio sólido se realizaron con medio LB complementado con agar al 1,5% (peso/volumen). Para los cultivos en condiciones anóxicas, se añadió KNO₃ 10 mM como aceptor final de electrones. Cuando fueron requeridos, los antibióticos se utilizaron a las concentraciones que se indican de ampicilina (Ap) 100 µg/ml, kanamicina (Km) 50 µg/ml y gentamicina (Gm) 10 µg/ml. Los antibióticos se prepararon en soluciones 1000 veces concentradas en agua. Estas soluciones se esterilizaron por filtración y se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

Para algunos cultivos de hiperproducción de proteínas el medio rico empleado fue *Terrific Broth* (TB) (*Cold Spring Harb Protoc*, 2006) y contiene 12 g de triptona, 24 g de

extracto de levadura, 0,4% de glicerol, 16,4 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ y 2,31 g de KH_2PO_4 por litro, pH 7,5.

El medio de cultivo CFA (*Colony Forming Antigen*) (Jackson y cols., 2002) fue empleado para la formación de biopelículas en *E. coli*, y contiene 10 g de casaminoácidos, 1,5 g de extracto de levadura, 50 mg de $MgSO_4$ y 5 mg de $MnCl_2$ por litro, pH 7,4.

2.2. Medios de cultivo empleados para *Azoarcus* sp. CIB.

El medio mínimo empleado en este trabajo para cultivar las cepas de *Azoarcus* sp. CIB está basado en el medio basal MA (pH 7,5), cuya composición se detalla a continuación:

| | |
|----------------------|-----------|
| KH_2PO_4 | 0,33 g |
| Na_2HPO_4 | 1,2 g |
| NH_4Cl | 0,11 g |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0,1 g |
| $CaCl_2$ | 0,04 g |
| H_2O destilada | Hasta 1 l |

Este medio basal fue suplementado con una solución de elementos traza (pH 6.5), cuya composición (1000x) se detalla a continuación:

| | | | |
|-------------------------------|--------|----------------------------|-----------|
| Ácido nitrilotriacético (NTA) | 1,5 g | $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0,18 g |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 3,0 g | $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ | 0,01 g |
| $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ | 0,5 g | $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ | 0,02 g |
| NaCl | 1,0 g | H_3BO_3 | 0,01 g |
| $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0,1 g | $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ | 0,01 g |
| $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0,18 g | $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ | 0,025 g |
| $NaSeO_3 \cdot 5H_2O$ | 0,3 g | H_2O destilada | Hasta 1 l |

También se suplementó el medio MA con una solución de vitaminas cuya composición (1000x) es la siguiente:

| | | | |
|-------------------------------|-------|----------------------|-----------|
| Biotina | 20 mg | Ácido fólico | 20 mg |
| Piridoxina-HCl | 10 mg | Tiamina.HCl· $2H_2O$ | 50 mg |
| Riboflavina | 50 mg | Ácido nicotínico | 50 mg |
| D-Pantotenato cálcico | 50 mg | Vitamina B_{12} | 50 mg |
| Ácido <i>p</i> -aminobenzoico | 50 mg | H_2O destilada | Hasta 1 l |

Para el crecimiento anaeróbico de *Azoarcus* sp. CIB se añadió KNO_3 10 mM, como aceptor final de electrones, al medio MC (medio basal complementado con vitaminas y elementos traza). Además, para asegurar el ambiente reductor, se añadió al medio MC una solución de sulfuro ferroso a una concentración final de 0,044 mg/ml. Para *Azoarcus* sp. CIB las concentraciones finales de antibióticos utilizadas fueron kanamicina (Km) 30 $\mu\text{g/ml}$ y gentamicina (Gm) 7 $\mu\text{g/ml}$

2.3. Obtención de condiciones anaeróbicas en los medios de cultivo.

Para obtener condiciones de anaerobiosis, el medio de cultivo así como las soluciones de elementos traza, nitrato potásico, sulfuro ferroso y todos los compuestos que fueron utilizados como fuente de carbono, se dispensaron en frascos de vidrio, los cuales se taparon con tapones de goma y se sellaron con arandelas de aluminio. A través del tapón de goma se inyectó una aguja conectada a un depósito de nitrógeno (Air Liquide), permitiendo pasar un flujo de este gas al medio líquido durante varios minutos con el objeto de eliminar el oxígeno. Finalmente, todos los frascos fueron autoclavados. Para obtener una solución anaeróbica y estéril de vitaminas (las cuales son sensibles al calor) se realizó la misma operación descrita anteriormente pero con frascos de vidrio vacíos en los que, después de ser esterilizados por autoclave, se inyectó la solución de vitaminas mediante una jeringa conectada a un filtro estéril Millipore (de 0,2 μm de diámetro de poro). Una vez preparadas estas soluciones, fueron añadidas al medio basal MA para obtener así el medio MC complementado con las correspondientes fuentes de carbono. Tanto la filtración de las soluciones de vitaminas como la inoculación de los medios de cultivo con las distintas cepas bacterianas, se realizaron en una cámara de anaerobiosis (Forma Scientific).

2.4. Condiciones de cultivo.

Para los cultivos aeróbicos, las cepas de *E. coli* se cultivaron a 37 o 30°C, y *P. aeruginosa* y *Azoarcus* sp. CIB se cultivaron a 30°C, con una agitación de 250 rpm. Todas las estirpes bacterianas fueron incubadas a 30°C sin agitación para su crecimiento anaeróbico utilizando KNO_3 10 mM como aceptor final de electrones. Cuando se utilizó benzoato como fuente de carbono, éste se añadió al medio MC a una concentración de 3 mM. Para el empleo de tolueno, como fuente de carbono éste se

añadió a una concentración de 250 mM en 2 ml de una fase orgánica de 2,2,4,4,6,8,8-heptametilnonano (HMN) que fue añadida al medio de cultivo (15 ml). Atendiendo al log Po/w del tolueno (2.8), la concentración de este compuesto en la fase acuosa cuando se añade a una concentración de 250 mM en HMN es de 0,4 mM. Las fuentes de carbono no aromáticas, como por ejemplo sales de ácidos orgánicos (piruvato, succinato, glutarato, etc) fueron añadidos a los medios de cultivo en una relación 0,2% (m/v) salvo que se indique lo contrario.

El crecimiento de los cultivos fue monitorizado midiendo la absorbancia a 600 nm (A_{600}) empleando un espectrofotómetro Shimadzu UV-260. La morfología celular se analizó con un microscopio de contraste de fase Nikon OPTIPHOT-2. La desnitrificación en cultivos anaeróbicos fue monitorizada midiendo los niveles de NO_3^- y NO_2^- con el Test Nitrates (Merck).

2.5. Conservación de las cepas bacterianas.

Durante cortos períodos de tiempo (inferiores a un mes) *E. coli* se conservó a 4°C en placas de medio LB. Los cultivos anaeróbicos de *Azoarcus* sp. CIB se conservaron adecuadamente durante un periodo aproximado de un mes a 4°C en viales de vidrio. Para su conservación a largo plazo, las bacterias se congelaron en el medio de cultivo correspondiente con glicerol al 15 % (v/v) y se mantuvieron a -80°C.

3. Técnicas de manipulación de DNA y RNA.

La manipulación del DNA así como la mayor parte de las técnicas de biología molecular utilizadas en este trabajo fueron aplicadas esencialmente tal y como describen Sambrook y Rusell (2001). Las endonucleasas de restricción fueron suministradas por New England Biolabs y Takara. La DNA ligasa T4 fue suministrada por USB y New England Biolabs. La DNA polimerasa I y la *Pfu* polimerasa fueron suministradas por Biotools B. M. Labs. Todas las enzimas se emplearon atendiendo a las especificaciones de las diferentes casas comerciales. Los fragmentos de DNA se purificaron mediante los productos *GeneClean Turbo* (Q-BIOgene), *Illustra™ PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE Healthcare) o *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche).

3.1. Extracción y purificación de DNA.

La purificación de DNA plasmídico se realizó mediante el uso de *High Pure Plasmid Purification Kit* (Roche). Para obtener mayores volúmenes de preparaciones plasmídicas, se utilizó el *Plasmid Midi Kit* (Qiagen). El DNA cromosómico se extrajo empleando el procedimiento descrito por Wilson (1997). La concentración y pureza del DNA obtenido se analizó mediante un análisis espectrofotométrico de A_{260} y del ratio A_{260}/A_{280} respectivamente, (Nanophotometer Pearl, IMPLEN) y visualización en geles de agarosa.

3.2. Reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente (PCR).

La amplificación del DNA se realizó en un equipo *Mastercycler Gradient* (Eppendorf) y las enzimas que se emplearon fueron la DNA polimerasa I termorresistente *Taq*, y la polimerasa *Pfu*. Las mezclas de reacción contenían $MgCl_2$ 1,5 mM, oligonucleótidos 0,5 μM y dNTPs 0,25 mM. Los distintos oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR se indican en la Tabla 3, en la que se detallan la secuencia de nucleótidos y la finalidad del producto de PCR. Las condiciones estándar de PCR fueron las siguientes: un primer ciclo de 95°C 5 min, seguido de 30 ciclos de 95°C 1 min, 60°C 1 min (o la temperatura adecuada, optimizada por gradiente según los oligonucleótidos utilizados), 72°C 1 min por cada 1000 pb según el fragmento a amplificar, y un ciclo final de 72°C 3 min. Los oligonucleótidos empleados en este trabajo se muestran en la Tabla 3. Todos los oligonucleótidos fueron adquiridos a Sigma-Aldrich.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados. Las regiones subrayadas pertenecen a la diana de restricción que se indica al final de la secuencia.

| Nombre | Secuencia (5'→3') (Diana restricción) | Utilización |
|------------|---|--|
| pETToIR 5' | GGAATTCCATATGTCGACGTTTCGATCGTCAG (NdeI) | Clonación de <i>toIR</i> en pET29a y sus derivados |
| pETToIR 3' | CCCAAGCTTCTGCCGTTCCGCTGAGC (HindIII) | Clonación de <i>toIR</i> en pET29a y sus derivados |
| pIZ2133 5' | CGCAAGCTTTGACCTAAGGAGGTAAATAGTGAACGGTTCC CCACAGG (HindIII) | Subclonación de PA2133 en pIZ1016 |
| pIZ2133 3' | CGCTCTAGATCACCCCTGGCGGCTCGC (XbaI) | Subclonación de PA2133 en pIZ1016 |

| | | |
|------------------|--|--|
| gToISR 5' | CCCAAGCTTTGACCTAAGGAGGTAAGCGATGTCGACGTTC GATCGTCAGTTATTCTCC (HindIII) | Clonación de <i>tolR</i> ^{H190V} y <i>tolR</i> ^{F79A} en pIZ1016 |
| gToISR 3' | GCTCTAGAGGGGCCATACGGGAACCGCGC (XbaI) | Clonación de <i>tolR</i> ^{H190V} y <i>tolR</i> ^{F79A} en pIZ1016 |
| ToIR int Val 3' | TGCGCAACTCGACGCTCAGGTT | Clonación de <i>tolR</i> ^{H190} en pET29a y pIZ1016 |
| ToIR int Val 5' | CAACCTGAGCGTCGAGTTGCGC | Clonación de <i>tolR</i> ^{H190} en pET29a y pIZ1016 |
| ToIR 1380 3' | CCGAGCACCTCGACGATGTATTGCCGCATG | Clonación de <i>tolR</i> ^{H190} en pET29a y pIZ1016 y <i>tolR</i> ^{F79} en pIZ1016 |
| ToIR 1380 5' | CATGCGGCAATACATCGTCGAGGTGCTCGG | Clonación de <i>tolR</i> ^{H190} en pET29a y pIZ1016 y <i>tolR</i> ^{F79} en pIZ1016 |
| ToIR 2420 3' | GTATTGAGATCGAGCTTGGGCTGGCAGTAG | Clonación de <i>tolR</i> ^{H190} en pET29a y pIZ1016 y <i>tolR</i> ^{F79} en pIZ1016 |
| ToIR 2420 5' | CTACTGCCAGCCCAAGCTCGATCTCAATAC | Clonación de <i>tolR</i> ^{H190} en pET29a y pIZ1016 y <i>tolR</i> ^{F79} en pIZ1016 |
| ToIR int F79A 3' | GCGCTTCCCATGCAAGGCTTGCCC | Clonación de <i>tolR</i> ^{F79} en pIZ1016 |
| ToIR int F79A 5' | GGGCAAGCCTGCATGGGAAGCGC | Clonación de <i>tolR</i> ^{F79} en pIZ1016 |
| TutC 3' | GCTCTAGATCTTTTCGGAATCCGCTGCGGC | Secuenciación de <i>tolR</i> |
| 3T3.5 | GCCTTCAAATTCACGCCGATCGG | Secuenciación de <i>tolR</i> |
| pETrec 5' | CATATGCCCGCGGCGGACGACGTGCC | Secuenciación de <i>tolR</i> |
| 3T3.6 | GCCGAATCGGTGCAGGACTATG | Secuenciación de <i>tolR</i> |
| ToIR int 2 | GTCATCCATCGCAACGCGG | Secuenciación de <i>tolR</i> |
| pETPASHK 3' | CCCAAGCTTCGTCATCGATGTCCCGC (HindIII) | Clonación de <i>tolR</i> _{SK} en pET29a |
| pTYBREC 5' | CCC <u>CATATG</u> CCCGCGGCGGACGAC (NdeI) | Clonación de <i>tolR</i> _{RR} en pTYB12 |
| pTYBREC 3' | CCGTCGACCTACTGCCCGTTCGCCCTG (SalI) | Clonación de <i>tolR</i> _{RR} en pTYB12 |
| Intein forward | GAGTGACGTTTTTCGTCGCCGCC | Secuenciación fragmentos de DNA clonados en plásmidos que contienen la proteína inteína |
| pIZPASHK 5' | CCAAGCTTTGACCTAAGGAGGTAAATAATGTCGACGTTCG ATC (HindIII) | Clonación de <i>tolR</i> _{SK} en pIZ1016 |
| pIZPASHK 3' | CCACTAGTCTACGCATCGATGTCCCG (SpeI) | Clonación de <i>tolR</i> _{SK} en pIZ1016 |
| pIZREC 5' | CCACTAGTTGACCTAAGGAGGTAAATAATGTCGCTCGTCA TCGTCGCCGA (SpeI) | Clonación de <i>tolR</i> _{RR} en pIZ1016 |
| pIZREC 5' | CCTCTAGACTACTGCCCGTTCGCCCTGAGC (XbaI) | Clonación de <i>tolR</i> _{RR} en pIZ1016 |

Materiales y métodos

| | | |
|--------|--------------------------|---|
| F24 | CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC | Secuenciación fragmentos de DNA clonados en plásmidos que portan el gen <i>lacZa</i> (pIZ1016) |
| R24 | AGCGGATAACAATTTACACAGGA | Secuenciación fragmentos DNA clonados en plásmidos que portan el promotor <i>Plac</i> o derivados |
| T7 | TAATACGACTCACTATAGGG | Secuenciación fragmentos de DNA clonados en plásmidos que contienen el promotor T7 |
| TT7 | GCTAGTTATTGCTCAGCGG | Secuenciación fragmentos de DNA clonados en plásmidos que contienen el terminador transcripcional TT7 |
| cdrA F | TCAACCCCAACGAGATCAAGA | Extremo 5' de un fragmento interno de 100 pb del gen <i>cdrA</i> que codifica una adhesina de matriz extracelular en <i>P.aeruginosa</i> PAO1 |
| cdrA R | CGAAGCCCTTCCAGTTGATG | Extremo 3' de un fragmento interno de 100 pb del gen <i>cdrA</i> que codifica una adhesina de matriz extracelular en <i>P.aeruginosa</i> PAO1 |
| ampR F | GCGCCATCCCTTCATCG | Extremo 5' de un fragmento interno de 50 pb del gen housekeeping <i>ampR</i> que codifica un regulador de los genes de resistencia a ampicilina en <i>P.aeruginosa</i> PAO1 |
| ampR R | GATGTCGACGCGTTGTTG | Extremo 3' de un fragmento interno de 50 pb del gen housekeeping <i>ampR</i> que codifica un regulador de los genes de resistencia a ampicilina en <i>P.aeruginosa</i> PAO1 |

3.3. Secuenciación automática de DNA.

La secuenciación se llevó a cabo utilizando un secuenciador automático modelo *ABI Prism 37 automated DNA sequencer* (Applied Biosystems Inc), en el Servicio de Secuenciación Automática de DNA gestionado por la empresa Secugen S. L. en el Centro de Investigaciones Biológicas. Para la reacción de secuenciación se utilizó el *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems), y la DNA

polimerasa AmpliTaq FS, siguiendo las recomendaciones de los proveedores. Las reacciones se llevaron a cabo con un termociclador *Gene Amp PCR System 2400* (Perkin-Elmer).

3.4. Extracción y purificación de RNA.

La purificación del RNA se realizó partiendo de las células bacterianas resuspendidas en una solución de lisozima 50 mg/ml (Sigma) en tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM). A continuación el RNA total del cultivo se aisló mediante el *RNeasy Mini kit* (Qiagen), siguiendo las indicaciones del proveedor o bien mediante el *High Pure RNA Isolation kit* (Roche).

Para la eliminación del DNA contaminante se empleó el *DNAse and Removal treatment kit* (Ambion), siguiendo las especificaciones del fabricante. La concentración y pureza del RNA obtenido se analizó mediante un análisis espectrofotométrico de A_{260} y del ratio A_{260}/A_{280} respectivamente, manteniéndose siempre entre 1,8 y 2 (Nanophotometer Pearl, IMPLEN), y visualización en geles de agarosa.

3.5. Ensayos de retrotranscripción (RT-PCR) y RT-PCR en tiempo real.

Una vez purificado el RNA y eliminado el DNA contaminante, se obtuvo el DNA complementario (cDNA) mediante una reacción de retrotranscripción mediada por la transcriptasa reversa del *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit* (Roche). Cada reacción de retrotranscripción (20 μ l) contenía 1 μ g de RNA, 10 U de transcriptasa reversa, 20 U de inhibidor de RNasas, dNTPs 1 mM y 60 μ M *random hexamer primer* del kit. Los hexámeros se emplearon como cebadores para poder utilizar las mismas alícuotas de cDNA como molde para reacciones de PCR en las que se emplean diversos pares de oligonucleótidos. El RNA y los hexámeros se incubaron a 65°C durante 10 min para la hibridación, y tras enfriar en hielo se añadieron los restantes componentes de la reacción, que se incubó 10 min a 25°C seguido de un ciclo de 30 min a 55°C. La reacción se finalizó con una incubación de 5 min a 85°C. Se empleó 1 μ l del cDNA así obtenido como molde para la PCR de comprobación posterior. El cDNA se amplificó utilizando los oligonucleótidos requeridos en cada caso a concentración final 0,5 μ M y 1 U de la DNA polimerasa I (Biotools). En cada una de las reacciones de PCR se incluyó un control con 1 μ l de la reacción de retrotranscripción en la que no se empleó la

transcriptasa reversa. Con este control se corroboró que no existía ninguna banda de amplificación indicativa de que la preparación de RNA contuviera DNA contaminante. El volumen total de la reacción de PCR fue de 50 µl, y 40 los ciclos de amplificación.

Para la PCR a tiempo real, se utilizó un termociclador LightCycler®480 II Real-Time PCR Instrument (Roche). El volumen de cada reacción fue de 20 µl, que contenían 1 µl de cDNA de la mezcla de la reacción de la retrotranscripción, 0,25 µM de los oligonucleótidos 5' y 3', 10 µl de SYBR Green Master Mix (Roche). Las parejas de oligonucleótidos utilizadas para amplificar los mRNA del gen *cdrA*, fueron *cdrA* F / *cdrA* R (Tabla 3). El gen *ampR*, que codifica el regulador transcripcional de los genes implicados en la resistencia a ampicilina cuya expresión se ha demostrado constitutiva en *P. aeruginosa* (Borlee y cols., 2010), fue utilizado como control interno en las reacciones de PCR a tiempo real, empleando la pareja de oligonucleótidos *ampR* F / *ampR* R (Tabla 3).

Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo de la siguiente forma: un ciclo inicial de desnaturalización (95°C, 5 min), seguido de 55 ciclos de amplificación (desnaturalización, 95°C, 10 seg; hibridación, 60°C, 10 seg; elongación y medida de la señal, 72°C, 10 seg) y un ciclo final de desnaturalización. Para la cuantificación relativa de los valores de fluorescencia obtenidos, se realizó una curva de calibrado con las mismas parejas de oligonucleótidos y con diluciones seriadas de DNA genómico de *P. aeruginosa* PAO1. El análisis relativo de los datos se realizó relativizando a la expresión a la muestra en ausencia de inductor.

3.6. Mutagénesis dirigida del gen *tolR*: construcción de los plásmidos *pIZtolR^{H190V}* y *pIZtolR^{F79A}*.

La construcción del gen *tolR* mutante en la His¹⁹⁰ (*tolR^{H190V}*), y del gen *tolR* mutante en la Phe⁷⁹ (*tolR^{F79A}*) (Fig. 6) se llevó a cabo en los dos casos mediante mutagénesis dirigida en dos etapas sucesivas de PCR. En una primera etapa, se amplificó el gen en cuatro fragmentos (A-D), utilizando DNA genómico de *Azoarcus* sp. CIB como molde y los oligonucleótidos que se indican a continuación, y cuya secuencia se detalla en la Tabla 3 y en el Anexo I.

Para generar el gen mutante *tolR^{H190V}*, el primer fragmento comprende desde la secuencia que hibrida con el oligonucleótido gTolSR 5', hasta la secuencia que contiene

el codón localizado en la posición 190 que se sustituye en el oligonucleótido TolRintVal 3'. Y para generar el mutante *tolR*^{F79A}, el primer fragmento comprende desde la secuencia que hibrida con el oligonucleótido gTolSR 5', hasta la secuencia que contiene el codón localizado en posición 79 que se sustituye en el oligonucleótido TolRintF79A 3'. Los otros tres fragmentos son comunes para ambas construcciones. El segundo fragmento comprende desde la secuencia que incluye la mutación donde hibrida el oligonucleótido TolRintVal 5' en el caso de *tolR*^{H190V}, y TolRintF79A 5' en el caso de *tolR*^{F79A}, hasta el codón localizado en posición 460 que hibrida con el oligonucleótido TolR 1380 3'. El tercer fragmento comprende desde la secuencia donde hibrida el oligonucleótido TolR 1380 5' hasta la secuencia donde hibrida el oligonucleótido TolR 2420 3'. El último fragmento comprende desde la secuencia donde hibrida el oligonucleótido TolR 2420 5' hasta el codón *stop* del gen *tolR*, que hibrida con el oligonucleótido gTolSR 3'. Todos los fragmentos se amplificaron usando unas condiciones de PCR estándar y polimerasa *Pfu*.

En la segunda etapa de PCR (PCR solapante), se utilizaron como molde los cuatro fragmentos obtenidos anteriormente, que solapan en la región de la mutación y en la región de los oligonucleótidos empleados para amplificarlos, sin añadir oligonucleótidos y usando una mezcla de polimerasas *Taq* y *Pfu*. Las condiciones de PCR fueron 45 ciclos cada uno de los cuáles consistía en una desnaturalización a 95°C 3 min, seguida de una polimerización a 72°C 6 min. Finalmente, se amplificaron los fragmentos procedentes de la PCR solapante con los oligonucleótidos gTolSR 5' y gTolSR 3', los cuales hibridan al inicio y al final del gen *tolR*, regenerando así, un gen completo que incluye la sustitución His por Val en el residuo número 190 de la proteína TolR en el caso de TolR^{H190V}, o la sustitución Phe por Ala en el residuo número 79 de la proteína TolR en el caso de TolR^{F79A}, empleando unas condiciones de PCR estándar y usando polimerasa *Pfu*, con una etapa de amplificación a 72°C de 8 min. Los productos de PCR obtenidos fueron purificados.

Los genes *tolR*^{H190V} y *tolR*^{F79A} se clonaron en el vector pIZ1016 (Tabla 2) empleando las dianas de restricción HindIII/XbaI y NdeI/HindIII, generando el plásmido pIZtolR^{H190V} y pIZtolR^{F79A}, respectivamente. La incorporación de las mutaciones fue comprobada mediante secuenciación.

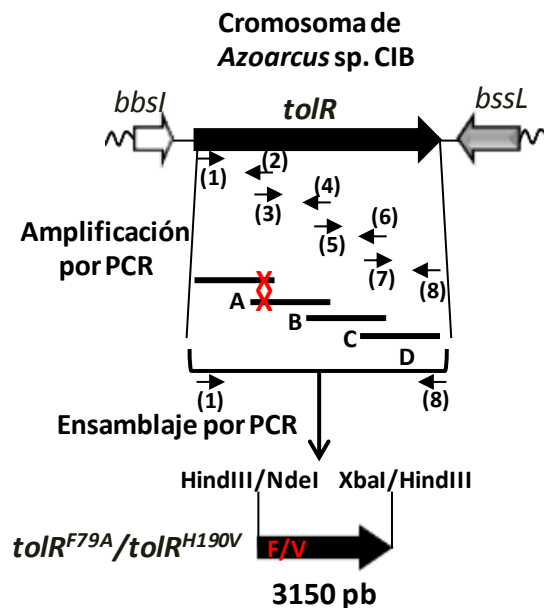


Figura 6. Representación esquemática de la construcción de los genes $tolR^{H190}$ y $tolR^{F79}$. Las parejas de oligonucleótidos usadas para amplificar los 4 fragmentos A-D, quedan representados de manera general del 1 al 8, y se detallan en el texto.

3.7. Construcción de las fusiones génicas $tolR$ -His₆, $tolR^{H190V}$ -His₆, $tolR_{SK}$ -His₆ e Int- $tolR_{RR}$.

La construcción de las fusiones génicas $tolR$ -His₆, $tolR^{H190V}$ -His₆, $tolR_{SK}$ -His₆ e Int- $tolR_{RR}$ se llevó a cabo mediante amplificación por PCR de los fragmentos de DNA que codifican la proteína completa, la proteína completa con la sustitución His¹⁹⁰Val, el supradominio N-terminal de TolR (dominio sensor PAS y AK) y el supradominio C-terminal de TolR (dominios REC, DGC y PDE), respectivamente, utilizando DNA genómico de *Azoarcus* sp. CIB como molde. Para la amplificación de $tolR$ se empleó la pareja de oligonucleótidos pETTolR 5'/pETTolR 3' (Tabla 3). Para la amplificación de $tolR^{H190V}$ se emplearon las parejas de oligonucleótidos pETTolR 5'/TolRintVal 3', TolRintVal 5'/TolR 1380 3', TolR 1380 5'/TolR 2420 3' y TolR 2420 5'/pETTolR 3' como se detalla en el apartado 3.6 (Tabla 3). Para la amplificación de $tolR_{SK}$ se empleó la pareja de oligonucleótidos pETTolR 5'/pETPASHK 3' (Tabla 3). Finalmente, para la amplificación de $tolR_{RR}$ se empleó la pareja de oligonucleótidos pTYBREC 5'/pTYBREC 3' (Tabla 3). Los fragmentos amplificados de $tolR$, $tolR^{H190V}$ y $tolR_{SK}$ fueron clonados en el plásmido de hiperexpresión pET29a (Tabla 2) empleando las enzimas de restricción *NdeI* y *HindIII*, con un tag que codifica 6 His en su extremo 3', generándose los plásmidos pETTolR, pETTolR^{H190V} y pETTolR_{SK} (Tabla 2). El fragmento amplificado de

tol_{RR} fue clonado en el plásmido de hiperexpresión pTYB12 (Tabla 2), como fusión con una inteína en su extremo 5', generándose el plásmido pTYB*tol_{RR}* (Tabla 2). Las construcciones resultantes clonadas en el vector pET29a fueron transferidas a la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (Tabla 1). La construcción pTYB*tol_{RR}* fue transferida a la cepa *E. coli* ER2566 (Tabla 1).

3.8. Construcción de los plásmidos pIZ*tol_{RR}* y pIZ*tol_{SK-RR}*.

La construcción del plásmido pIZ*tol_{RR}* se llevó a cabo mediante amplificación por PCR del fragmento de DNA que codifica el supradominio C-terminal de TolR (dominios REC, DGC y PDE), utilizando DNA genómico de *Azoarcus* sp. CIB como molde. Para la amplificación de *tol_{RR}* se empleó la pareja de oligonucleótidos pIZREC 5'/pIZREC 3' (Tabla 3) usando condiciones estándar de PCR. El fragmento amplificado de *tol_{RR}* fue clonado en el plásmido pIZ1016 usando las dianas *SpeI* y *XbaI*, generándose el plásmido pIZ*tol_{RR}* (Tabla 2).

La construcción del plásmido pIZ*tol_{SK-RR}* se llevó a cabo mediante amplificación por PCR del fragmento de DNA que codifica el supradominio N-terminal de TolR (dominio sensor PAS y AK), utilizando DNA genómico de *Azoarcus* sp. CIB como molde. Para la amplificación de *tol_{RR}* se empleó la pareja de oligonucleótidos pIZPASHK 5'/pIZPASHK 3' (Tabla 3) usando condiciones estándar de PCR. El fragmento amplificado de *tol_{SK}* fue clonado en el plásmido pIZ*tol_{RR}* usando las dianas *HindIII* y *SpeI*, generándose el plásmido pIZ*tol_{SK-RR}* (Tabla 2).

4. Procedimientos de transferencia genética.

4.1. Transformación de células de *E. coli* y *P. aeruginosa* mediante choque térmico o electroporación.

Las células de *E. coli* se transformaron utilizando dos procedimientos distintos: choque térmico y electroporación. Las células de *P. aeruginosa* se transformaron exclusivamente por electroporación. La transformación por choque térmico requiere la preparación previa de células competentes con RbCl (Sambrook y Russell, 2001). La transformación por electroporación (Wirth y cols., 1989) se llevó a cabo en un equipo Gene Pulser/Pulse Controller (Bio-Rad), según las recomendaciones del fabricante, utilizando las siguientes condiciones: 2,5 kV, 25 μ F, 200 Ω .

4.2. Transformación de células de *Azoarcus* sp. CIB mediante electroporación.

Empleando como preinóculo un cultivo anaeróbico de *Azoarcus* sp. CIB en benzoato, se prepara un cultivo aeróbico (200 ml) en medio MC complementado con glutarato 0,2 % (m/v) en un matraz Erlenmeyer de 500 ml. El cultivo se incuba 16 h en agitación a 30°C hasta que alcanza una absorbancia a 600 nm de en torno a 0,2, y las células se recogen por centrifugación (1500g, 25 min) a 4°C. A continuación, las células se resuspenden en 10 ml de glicerol 10 % y se lavan 2 veces centrifugándolas a 4°C (1300g, 15 min). Finalmente, las células se resuspenden en 50 µl de glicerol 10% y se electroporan con 1 µg de DNA plasmídico en un electroporador Gene Pulser/Pulse Controller (Bio-Rad) a 2,5 kV, 200 Ω y 25 µFa. Las células se traspasan a medio MC complementado con glutarato 10 mM y se incuban 1 h a 30°C en agitación. Finalmente las bacterias transformantes se seleccionan en medio sólido MC complementado con glutarato 10 mM más el antibiótico correspondiente.

5. Ensayos de choque de tolueno.

Las cepas *Azoarcus* sp. CIB, *Azoarcus* sp. CIB*dtolR*(pIZ*tolR*), *Azoarcus* sp. CIB*dtolR*(pIZ2133), *Azoarcus* sp. CIB*dtolR* (pIZ*tolR*^{H190}), *Azoarcus* sp. CIB*dtolR* (pIZ*tolR*_{SK-RR}) y *Azoarcus* sp. CIB*dtolR* (pIZ*tolR*_{SK}) (Tabla 1) se emplearon en el ensayo de choque de tolueno.

Las cepas de *Azoarcus* sp. CIB se crecieron anaeróbicamente en medio líquido MC con piruvato 0.2% como fuente de carbono y KNO₃ 10 mM como aceptor final de electrones e IPTG 1 mM a los cultivos que expresan el gen *tolR* en el plásmido pIZ*tolR* o sus derivados y se incubaron durante 16 h a 30°C. Una vez el cultivo alcanzó una A₆₀₀ de 0,3-0,4, se dividió en dos alícuotas y a una de ellas se le añadió tolueno 20 mM. Se incubaron durante 2 h más en agitación a 30°C y se tomaron muestras para la determinación de la viabilidad celular. Diluciones seriadas de las muestras se plaquearon en medio sólido MC conteniendo succinato 0,2% como fuente de carbono y se incubaron durante 2 días a 30°C procediéndose finalmente al recuento de las células viables.

6. Ensayos de quimiotaxis.

6.1. Ensayo de quimiotaxis a tiempos cortos (*Agarose Plug Assay*).

Para el ensayo de quimiotaxis a tiempos cortos se realizó el protocolo de Parales y Harwood, 2002 con modificaciones. Los cultivos celulares de *Azoarcus* sp. CIB, *Azoarcus* sp. CIB*dtolR* y *Azoarcus* sp. CIB*dtolR* (pIZ*tolR*) se realizaron anaeróbicamente en medio mínimo MC con piruvato 0,2 % como fuente de carbono (e IPTG 5 mM como inductor de la expresión del gen *tolR* en la cepa portadora del plásmido pIZ*tolR*), hasta alcanzar la fase exponencial. Se tomaron 150 μ l del cultivo y, en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, se depositaron en un portaobjetos que contiene una gota (10 μ l) de agarosa *low melting* (Ambion) al 2 % en solución MA 1x y 1 mM del compuesto a ensayar (atrayente) si no se especifica lo contrario, entre dos topes de una mezcla de parafina-vaselina (9:1 v/v) y el correspondiente cubreobjetos (Fig. 7).

Para conservar la anaerobiosis, se sellaron los bordes con laca de uñas antes de sacarlo fuera de la cámara de anaerobiosis. La preparación se observó al microscopio de contraste de fases (Nikon Optiphot-2) y se tomaron fotografías con una cámara Leica DFC345 FX del borde de la gota a los 5, 10 y 20 minutos con el objetivo de 10 aumentos.

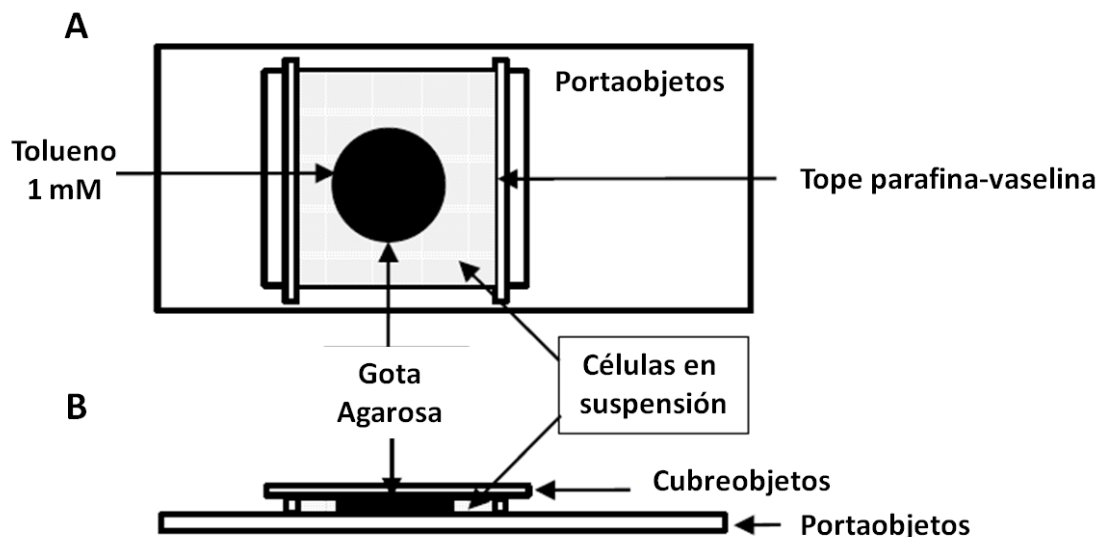


Figura 7. Esquema de la preparación microscópica utilizada para el ensayo de quimiotaxis (Agarose Plug Assay). A) En un portaobjetos se añade una gota de agarosa *low melting* al 2% en solución MA 1X y con tolueno 1 mM. Las células se depositan en el espacio localizado entre la gota de agarosa y los toques de parafina en el portaobjetos. Se sellan los bordes con laca para conservar la anaerobiosis. B) Sección transversal de la preparación.

6.2. Ensayo de quimiotaxis en placa de cultivo.

Para ensayar quimiotaxis en medio sólido se utilizan células de las cepas *Azoarcus* sp. CIB, *Azoarcus* sp. CIBdtolR y *Azoarcus* sp. CIBdtolR (pIZToIR) cultivadas en piruvato 0,2 % hasta alcanzar la fase exponencial. Dichas células se inoculan con 3 μ l en placas anaerobias con agar al 0.3%. Se utilizó medio mínimo MC suplementado con KNO₃ 10 mM, IPTG 5 mM, y, como fuente de carbono, una mezcla de piruvato 0,02 % más los distintos compuestos probados a 1 mM si no se especifica lo contrario. Se midió el diámetro del halo de crecimiento a lo largo de varios días hasta un máximo de 17 días de incubación en condiciones anaeróbicas, es decir haciendo e incubando las placas fuera o dentro de la cámara de anaerobiosis.

7. Ensayo de formación de biopelículas en placas multipocillo.

Para el ensayo de formación de biopelículas, se cultivaron anaeróbicamente las células de *E. coli* TRMG recombinantes durante 16 h en medio CFA con los antibióticos correspondientes. Se realizaron diluciones de estos cultivos hasta alcanzar una A_{600} de 0,05 en un volumen de 200 μ l de medio CFA con IPTG 1 mM en placas de poliestireno estériles de 96 pocillos, incubándose 16 h a 30°C en la cámara de anaerobios o aeróbicamente. Posteriormente, se añadieran a cada pocillo 50 μ l de cristal violeta 1%, incubándose durante 15 min a temperatura ambiente para después lavar con agua destilada tres veces dejando secar al aire los pocillos. Para la cuantificación de la biopelícula, se solubilizaron las células pegadas a las paredes y la base del pocillo con etanol, y se midió su absorbancia a 595 nm (O'Toole y Kolter, 1998). Al valor de A_{595} se le restó la absorbancia basal A_{595} debida al medio CFA sin células.

8. Técnicas de manipulación de proteínas.

8.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).

Las electroforesis analíticas de proteínas se realizaron en todos los casos en condiciones desnaturalizantes en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS). La técnica utilizada fue la descrita por Laemmli (1970) utilizando geles de poliacrilamida (PAGE) a diferentes concentraciones (7.5-12.5%). Las muestras se hirvieron a 100 °C durante 10 min en presencia del tampón de ruptura (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2 %, β -mercaptoetanol 5 %, glicerol 10 % y azul de bromofenol 0,005%). Las electroforesis se

realizaron a temperatura ambiente y a 150 V (corriente constante), utilizando un electrolito que contenía Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 192 mM y SDS 0,1 %. Las proteínas de los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250 (Swank y Munkres, 1971). Las proteínas empleadas como marcadores de masa molecular (miosina, 200 KDa; β -galactosidasa *E. coli*, 116.3 KDa; fosforilasa B, 97.4 KDa; BSA, 66.2 KDa; ovoalbúmina, 45 KDa; anhidrasa carbónica, 31 KDa; inhibidor de tripsina, 21.5 KDa; lisozima, 14.4 KDa y aprotinina, 6.5 KDa) se adquirieron en Bio-Rad.

8.2. Sobreproducción y purificación de proteínas.

8.2.1. Sobreproducción y purificación de TolR y TolR^{H190V}.

Las cepas *E. coli* BL21 (DE3) (pETtolR) y *E. coli* BL21 (DE3) (pETtolR^{H190V}) se emplearon para la sobreproducción de las proteínas TolR-His₆ y TolR^{H190V}-His₆, respectivamente. Todos los cultivos se realizaron en medio LB con Km (50 μ g/ml) incubados en agitación a 37°C. A partir de un preinóculo de células, se inocularon 10 ml de medio. Una vez el cultivo alcanzó una A_{600} de 1, se utilizó para inocular 1 l de medio a una A_{600} inicial de 0,05 y se incubó en agitación a 37°C. Una vez el cultivo alcanzó una A_{600} de 0,4, la temperatura de incubación se redujo a 30°C y cuando el cultivo alcanzó A_{600} de 0,6, se adicionó el inductor IPTG 0,1 mM y se continuó la incubación durante 16 h en agitación a 20°C. Las células se recogieron por centrifugación. En los casos en los que no se realizó directamente la purificación, las células se conservaron a -20°C.

Para la purificación se empleó el siguiente tampón de trabajo: Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, EDTA 0,1 mM, β -mercaptoetanol 5 mM, glicerol 5 %, imidazol (diferentes concentraciones), pH 8.

Las células se resuspendieron en 25 ml de tampón de trabajo al que se añadió una mezcla de inhibidores de proteasas (*Protease Inhibitor Cocktail Tablets Complete Mini EDTA-free*, Roche), según las especificaciones del fabricante, e imidazol 10 mM, y se procedió a la rotura de las mismas mediante tres pases sucesivos a través de la prensa de French (Aminco Corp.) a una presión de 20000 psi. El extracto obtenido se centrifugó a 4°C y 15000 rpm durante 1 h recuperándose el sobrenadante como la

fracción de extracto celular. El sobrenadante fue filtrado a través de un filtro de tamaño de poro 0,2 μm .

La purificación de las proteínas TolR-His₆ y TolR^{H190V}-His₆ se realizó empleando una columna de afinidad que contenía níquel (Ni-NTA, QIAGEN). Una vez equilibrada la columna con el tampón de resuspensión, se hizo pasar el extracto celular a través de la misma y se lavó con 15 volúmenes del mismo tampón. Finalmente, las proteínas fueron eluidas con el tampón de trabajo, conteniendo imidazol a una concentración de 100 mM. Se recogieron fracciones de 1 ml, y la concentración de proteína se estimó mediante espectrofotometría a 280 nm, teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar teórico de las proteínas ($84840 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Las alícuotas que presentaban una mayor absorbancia a 280 nm se analizaron mediante SDS-PAGE. Las fracciones que contenían proteínas del tamaño esperado se dializaron a 4°C en el tampón de análisis (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, KCl 200 mM, MgCl₂ 2 mM, EDTA 0,1 mM, glicerol 10 % y DTT 2 mM). Posteriormente, las proteínas fueron repartidas en alícuotas y almacenadas a –20°C durante al menos 3 meses sin observar pérdida de su actividad.

8.2.2. Sobreproducción y purificación de TolR_{SK}.

La cepa *E. coli* BL21 (DE3) (pETtolR_{SK}) fue empleada para la sobreexpresión de la proteína TolR_{SK}-His₆. En el proceso, se siguió el mismo procedimiento descrito en el apartado 8.2.1 de esta sección, salvo que la inducción se realizó empleando IPTG a una concentración de 0,5 mM y el cultivo se incubó 5 h en agitación a 30°C.

Para la purificación y posterior almacenaje de la proteína se siguió el mismo procedimiento descrito en el apartado 8.2.1 de esta sección.

8.2.3. Sobreproducción y purificación de TolR_{RR}.

La cepa *E. coli* ER2566 (pTYBtolR_{RR}) fue empleada para la sobreexpresión de la proteína TolR_{RR}. Todos los cultivos se realizaron en medio TB con Ap (100 $\mu\text{g/ml}$) incubados en agitación a 30°C. A partir de un preinóculo de células, se inocularon 10 ml de medio. Una vez el cultivo alcanzó una A_{600} de 1, se utilizó para inocular 1 l de medio a una A_{600} inicial de 0,05 y se incubó en agitación a 30°C. Una vez el cultivo alcanzó una A_{600} de 0,5, la temperatura de incubación se redujo a 18°C durante 30 min. Cuando el cultivo alcanzó A_{600} de 0,6, se adicionó el inductor IPTG 0,3 mM y se

continuó la incubación durante 16 h en agitación a 18°C. Las células se recogieron por centrifugación. En los casos en los que no se realizó directamente la purificación, las células se conservaron a -20°C.

Para la purificación se empleó el siguiente tampón de trabajo: Tris-HCl 20 mM, KCl 250 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8.

Las células se resuspendieron en 20 ml de tampón y se sometieron al mismo tratamiento descrito en el apartado 8.2.1 de esta sección hasta obtener el sobrenadante, considerado la fracción de extracto celular filtrado. A continuación, para la purificación de TolR_{RR} se hizo pasar el extracto celular a través de una columna de cromatografía de afinidad (*Chitin binding tag*, IMPACT SYSTEM, New England Biolabs) y se lavó con 10 volúmenes de tampón de resuspensión. Posteriormente, se añadieron 15 ml del mismo tampón conteniendo DTT a una concentración de 50 mM y se incubó durante 16 h a 20°C. Finalmente, las proteínas fueron eluidas recogiendo alícuotas de 1 ml. La concentración de proteína se estimó mediante el método de Bradford (1976) usando seroalbúmina bovina como estándar. Se analizaron mediante geles de SDS-PAGE, y las fracciones que contenían proteínas del tamaño esperado en SDS-PAGE y se dializaron a 4°C en el tampón de análisis (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, KCl 200 mM, MgCl₂ 2 mM, EDTA 0,1 mM, glicerol 10 % y DTT 2 mM). Posteriormente, las proteínas fueron repartidas en alícuotas y almacenadas a -20°C durante al menos 3 meses sin observar pérdida de su actividad.

9. Ensayos de actividad enzimática.

9.1. Ensayos de actividad β -galactosidasa.

Para los ensayos de actividad β -galactosidasa se emplearon células de *P. aeruginosa* PAO1pel portadoras de la fusión transcripcional *PpeIA::lacZ* (Tabla 1) y conteniendo distintos plásmidos recombinantes. Las células se cultivaron a 30°C en medio LB con IPTG 1 mM, y cuando se indica, el hidrocarburo aromático correspondiente hasta alcanzar la densidad óptica deseada en cada caso (mitad de la fase exponencial de crecimiento). La actividad β -galactosidasa se analizó permeabilizando las células, y las unidades de actividad enzimática (Unidades Miller) se determinaron según el método descrito por Miller (1972).

9.2. Ensayos de actividad autoquinasa.

Los ensayos de actividad autoquinasa de las proteínas TolR, TolR^{H190V} y TolR_{SK}, se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito por Lacal *et al.*, 2006, con algunas modificaciones en el tampón de análisis (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, KCl 200 mM, MgCl₂ 2 mM, EDTA 0,1 mM, glicerol 10 % (v/v) y DTT 10 mM). El ensayo de autofosforilación se realizó a 24°C en un volumen final de 100 µl de reacción en presencia de 1 µM de las proteínas purificadas y tras la adición de 10 µCi [γ -32P] ATP (3000 Ci/mmol, Perkin-Elmer Life Sciences) y 50 µM de ATP frío. En los casos en los que se especifica la adición de hidrocarburos aromáticos, éstos se añadieron a la concentración indicada (100 ó 500 µM) al inicio de la reacción de autofosforilación. Se tomaron muestras (20 µl) a diferentes tiempos de incubación y se paró la reacción mediante la adición de tampón TR. Las muestras fueron refrigeradas a 4°C y finalmente analizadas en SDS-PAGE al 7,5, 10 ó 12,5 %. Los geles se lavaron con H₂O destilada y se secaron sobre papel Whatman 3MM. Las proteínas fosforiladas se detectaron tras la exposición de los geles a una pantalla Imagine Plate BAS-MS 2340 (FUJIFILM), y fueron analizadas y cuantificadas con el Phosphorimager FUJIFILM FLA-3000 y el programa MultiGauge V3.0.

9.3. Ensayos de transferencia intramolecular del fosfato en TolR.

Los ensayos de transferencia de fosfato en la proteína TolR se llevaron a cabo en las condiciones descritas en el apartado 9.2. modificando los volúmenes. Se tomaron muestras (60 µl) a diferentes tiempos de incubación (0, 5, 15 y 45 min) y se paró la reacción mediante la adición de tampón TR. Las muestras se cargaron en tres geles idénticos SDS-PAGE del 7,5 %. Tras separar las proteínas, los geles se lavaron durante 30 min en una solución de isopropanol al 40 % antes de sumergirlos durante 30 min a 55°C en una de las siguientes soluciones: HCl 0,1 M, NaOH 0,2 M o Tampón HEPES 0,1 M pH 7,0. Los geles se lavaron nuevamente durante 30 min en una solución de isopropanol al 40 % y se secaron sobre papel Whatman 3MM. Los productos de la reacción se detectaron, analizaron y cuantificaron como se describe en el apartado 9.2 de esta sección.

9.4. Ensayos de transferencia intermolecular del fosfato o transfosforilación *in vitro*.

La proteína purificada TolR_{SK} y la proteína purificada TolR_{RR}, se mezclaron en la misma concentración molar (2,5 μ M) y se realizó el ensayo como se describe en el apartado 9.2 de esta sección, en presencia de tolueno 100 μ M. Se tomaron muestras a diferentes tiempos de ensayo (0, 5, 15 30 y 45 min) y se detectaron, analizaron y cuantificaron de la misma manera que se describe en el apartado 8.2.

9.5. Ensayos de consumo de ATP.

Los ensayos fueron llevados a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartados 9.2 de esta sección con modificaciones. El ensayo fue llevado a cabo a 24°C en presencia de 1 μ M de las proteínas purificadas (TolR o la mezcla TolR_{SK}/TolR_{RR}) y tolueno 100 μ M en un volumen final de 100 μ l de reacción tras la adición de 10 μ Ci [γ -32P] ATP (3000 Ci/mmol, Perkin-Elmer Life Sciences) y en ausencia de ATP frío. Se tomaron muestras (10 μ l) a diferentes tiempos de incubación y se paró la reacción mediante la adición de 2 μ l de EDTA 0,5 M. Las muestras fueron analizadas por cromatografía en capa fina (TLC) sobre placas de Polietilenimina-celulosa (TLC *PEI-cellulose F*, Merck-Millipore Corp.), cargando 2 μ l de cada muestra y revelando con tampón de análisis (KH₂PO₄ 0,75 M, pH 3,75). Las placas se dejaron secar al aire y los productos de la reacción (Pi y ADP) se detectaron, analizaron y cuantificaron como se describe en el apartado 9.2 de esta sección.

9.6. Ensayo enzimático de actividad fosfodiesterasa (PDE).

Para la obtención de extractos crudos de *E. coli* DH10B conteniendo los plásmidos pIZ1016, pIZTolR o pIZ2133, se cultivaron las células anaeróbicamente en medio LB con IPTG 1 mM y nitrato 10 mM como aceptor final de electrones, hasta alcanzar la mitad de la fase exponencial de crecimiento. Los cultivos se concentraron 50 veces, tras centrifugar y resuspender en el tampón PBS pH 7,3 al que se añadió PMSF 0,2 M como inhibidor de proteasas. Las células se lisaron por sonicación (3 pulsos de 10 segundos en un sonicador Branson) y los restos celulares se eliminaron por centrifugación. Los sobrenadantes fueron utilizados como extractos crudos en los ensayos de actividad fosfodiesterasa de di-GMPc. La concentración de proteína total en los extractos se

determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando BSA como patrón. La mezcla estándar de ensayo (200 µl) se realizó en tampón Tris-HCl 60 mM pH 7,5, conteniendo MgCl₂ 20 mM, como sustrato bis-*p*-nitrofenilfosfato (bis-pNPP) 5 mM y un volumen variable de extracto crudo celular. La actividad se determinó mediante la monitorización de la absorbancia a 405 nm con un espectrofotómetro Multiskan Ascent (Thermo Scientific) para detectar el producto de la reacción, *p*-nitrofenilfosfato (pNPP, amarillo), que se genera debido a la ruptura del compuesto análogo de di-GMPc bis-pNPP (incoloro) usado como sustrato, incubando a 30°C (Bobrov y cols., 2005).

10. Análisis transcriptómicos.

10.1. Construcción de librerías de cDNA para análisis transcriptómicos.

Para la construcción de las librerías de DNA se cultivaron las cepas *Azoarcus* sp. CIB y *Azoarcus* sp. CIB*dtolR* anaeróbicamente en medio líquido MC usando piruvato 0,2% como fuente de carbono y KNO₃ 10 mM como aceptor final de electrones, hasta que alcanzaron la fase exponencial media ($A_{600} \sim 0.35$). En ese momento se dividió el cultivo y a una de las dos muestras se le añadió tolueno 20 mM. Al cabo de 2 h de agitación a 30°C se recogieron los cultivos, se centrifugaron y se almacenaron las células a -80°C. Se procesan dos réplicas biológicas de cada condición. Se realizó la extracción y purificación del RNA como se detalla en el apartado 3.4 de esta sección. A continuación se procedió a la construcción de las librerías de DNA mediante el *Encore Complete Prokaryotic RNA-Seq DR Multiplex System 1–8 kit* (NuGen) cuyo protocolo se resume en la figura 8.

En primer lugar se sintetiza la primera hebra de DNA usando como cebadores hexámeros al azar en los que se han eliminado aquellos hexámeros que se unen preferentemente a secuencias de RNA ribosomal (rRNA). A continuación se sintetiza la segunda hebra usando un análogo de nucleótido. Posteriormente se fragmenta el cDNA usando el sistema Covaris (Covaris E-series, E210) para generar fragmentos de DNA con tamaño medio de 150 pb cuyos extremos se reparan para unir los adaptadores, que contienen el código de barras para diferenciar las muestras cuando se secuencien.

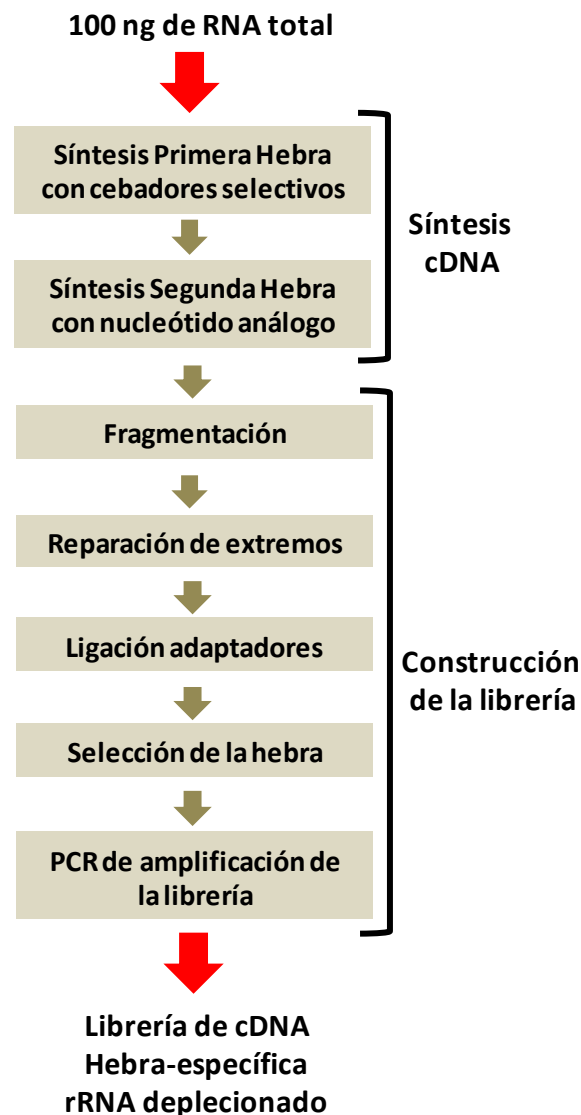


Figura 8. Esquema resumen del protocolo seguido para la generación de librerías de cDNA.

A continuación se produce una reacción de selección de hebra por reconocimiento y degradación de la hebra con el análogo del nucleótido, y finalmente se procede a la amplificación final de la librería. De esta forma se genera una librería de cDNA compuesta mayoritariamente por mRNA y que es hebra-específica, donde las lecturas resultantes alinearán en la hebra de la que se originó el RNA permitiendo la detección de la expresión tanto sentido como antisentido. Esta librería se secuenció mediante el sistema Illumina. Al procesarse dos réplicas biológicas de cada condición, en total se llevan en paralelo en una misma carrera y en una única calle las 8 muestras.

10.2. Análisis bioinformático de las secuencias: mapeo de lecturas y cuantificación de los transcritos.

El análisis de la calidad de las secuencias se realizó con el programa FastQC versión 0.11.2 de Babraham Institute (<http://bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Los programas empleados a continuación usaron los lenguajes de programación Perl y R. En primer lugar, las lecturas generadas se alinearon frente a la última versión del genoma de referencia de *Azoarcus* sp. CIB del que disponemos en el laboratorio utilizando el software de alineamiento de secuencias cortas Bowtie versión 0.12.8 (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>), utilizando sólo las secuencias sin errores y que asigna al azar las lecturas que alinean en varios puntos del genoma. Así, se pueden visualizar las lecturas ya alineadas en un navegador de genomas tipo IGV (*Integrative Genome Viewer*; Robinson y cols., 2011).

La cuantificación y normalización de las lecturas se realizó con el programa EDGE-pro (*Estimated Degree of Gene Expression in Prokaryotic Genomes*)(Magoc y cols., 2013) diseñado para transcriptómica de bacterias, que utiliza la anotación proporcionada para cuantificar las CDSs (*CoDing Sequence*) y eliminar los rRNAs y tRNAs en el cálculo de los niveles de RPKM (*Reads Per Kb of transcript per Million mapped reads*).

10.3. Cuantificación de la expresión diferencial.

Para llevar a cabo el estudio de expresión diferencial entre grupos de muestras, se utilizaron diferentes programas estadísticos diseñados en R. El cálculo de la significación estadística de un determinado test se realizó con el programa Bio-SAGE (<http://search.cpan.org/~scottzed/Bio-SAGE-Comparison-1.00/lib/Bio/SAGE/Comparison.pm>) empleando el método descrito por Audic y Claverie (Audic y Claverie, 1997). Así, se consideró como un gen diferencialmente expresado aquel que presentó un valor de *Fold Change* inferior a 0,5 o superior a 2 y con un *p-value* ajustado mediante un valor de FDR (*False Discovery Rate*) de < 0,05, cálculo que se realizó empleando el método descrito por Benjamini y Yekutieli (Benjamini y Yekutieli, 2001) en la versión implementada en el programa R versión 3.1.0 (<http://www.R-project.org/>).

11. Recursos informáticos.

11.1. Análisis bioinformáticos.

El análisis de las secuencias nucleotídicas se realizó con los siguientes programas y servidores: Chromas 2.01 (Technelysium Pty Ltd.), análisis cromatogramas procedentes de reacciones rutinarias de secuenciación; Bioedit *Sequence Alignment Editor* v7.0.3 (Hall, 1999), análisis de cromatogramas procedentes de reacciones rutinarias de secuenciación; Biosupport (<http://bioinfo.hku.hk/>), obtención de secuencias reversas y complementarias de DNA, traducción de secuencias de DNA a proteína; Expasy (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>), traducción de secuencias de DNA en los seis marcos de lectura simultáneamente. Las secuencias de nucleótidos y las secuencias deducidas de aminoácidos se compararon con las existentes en las bases de datos mediante el uso de los algoritmos BlastN y BlastP, respectivamente (Altschul *et al.*, 1990). El servidor seleccionado para ejecutar estos algoritmos fue el del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/BLAST.cgi>). La comparación de secuencias proteicas y los alineamientos múltiples de secuencias se realizó con el programa ClustalW (Thompson y cols., 1994) mediante el servidor EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). La predicción de localización subcelular de la proteína TolR se ha realizado con la aplicación PSLPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/pslpred/>) y PSORTb (<http://www.psort.org/psortb/>).

Como genoma de referencia de *Azoarcus* sp. CIB se empleó la secuencia ensamblada y anotada en el laboratorio. Para el análisis de genes se utilizó la base de datos KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (Kanehisa y Goto, 2000). Para la identificación de la función de los genes diferencialmente expresados, se empleó el servidor KAAS (*KEGG Automatic Annotation Server*) que consulta las KEGG Pathways.

Los oligonucleótidos se diseñaron empleando el programa Gene Runner 3.05 (Hastings Software Inc.).

Las propiedades teóricas de los productos proteicos se determinaron con la aplicación *ProtParam tool* (ExPASy Proteomics Server, Swiss Institute of Bioinformatics) a través del servidor <http://expasy.org/tools/protparam.html>.

El modelo de la estructura tridimensional del dominio sensor PAS de TolR se realizó con el programa I-TASSER Suite versión 4.1 (Zhang, 2008). Para el *docking* automático de las moléculas efectoras en el bolsillo de reconocimiento del inductor se empleó el programa Autodock versión 4.2 con ayuda de Autodock Tools (Morris y cols., 2009).

El análisis de la longitud de las células bacterianas en las fotos tomadas al microscopio óptico se realizó con el software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>; Schneider y cols., 2012).

11.2. Análisis estadísticos.

Todos los datos se analizaron con el programa SigmaPlot (versión 12.0). Todos los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza de una vía (*One-way ANOVA*) para determinar las diferencias significativas entre medias de los ensayos. El test Student–Newman–Keuls (SNK) se empleó para asegurar las diferencias significativas entre las distintas condiciones. Las diferencias estadísticas se representan como $P < 0,001$ (***), $P < 0,01$ (**) y $P < 0,05$ (*).

V. RESULTADOS

1. El gen *tolR* está implicado en la adaptación anaeróbica de *Azoarcus* sp. CIB a los hidrocarburos aromáticos.

Como se ha indicado en la Introducción, de todos los genes presentes en el *cluster bss-bbs* para la degradación anaeróbica de tolueno/*m*-xileno en *Azoarcus* sp. CIB (Fig. 5), el único que no se ha identificado en ninguno de los *clusters* equivalentes descritos hasta la fecha en otros microorganismos anaeróbicos degradadores de hidrocarburos aromáticos es el gen *tolR* (Blázquez, 2009). Al abordar su posible papel en la degradación anaeróbica de tolueno, se demostró que la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB*dtolR* portadora de un gen *tolR* inactivado por inserción era capaz de crecer con tolueno o *m*-xileno como únicas fuentes de carbono, y por ello, el gen *tolR* no parecía ser imprescindible para el crecimiento anaeróbico en estos hidrocarburos aromáticos. Por otro lado, el gen *tolR* tampoco parece estar implicado en la regulación transcripcional específica del *cluster bss-bbs* ya que ésta depende del sistema regulador de dos componentes TdiS-TdiR, que controla la expresión de los operones *bss* y *bbs* activando los promotores *PbssD* y *PbbsA* respectivamente (Blázquez, 2009) (Fig. 5).

Dado que la proteína TolR posee dominios presuntamente implicados en el metabolismo del di-GMPc (Fig. 5), y que este segundo mensajero bacteriano está involucrado en el control de diferentes procesos fisiológicos tales como movilidad, formación de biopelículas, virulencia, diferenciación, etc. (Römling y cols., 2013), se decidió iniciar los estudios para demostrar el papel del gen *tolR* en el control de alguno de estos procesos en *Azoarcus* sp. CIB, y su posible implicación en la adaptación de la bacteria a la presencia de hidrocarburos aromáticos.

1.1. El gen *tolR* está implicado en la quimiotaxis de *Azoarcus* sp. CIB a tolueno en anaerobiosis.

Estudios preliminares sugerían que *Azoarcus* sp. CIB es una bacteria móvil que posee quimiotaxis positiva a tolueno, la cual se reduce en *Azoarcus* sp. CIB*dtolR*, una cepa mutante que posee una interrupción insercional del gen *tolR* (Tabla 1) (Blázquez, 2009). Para estudiar con más detalle el papel del gen *tolR* en la respuesta quimiotáctica de *Azoarcus* sp. CIB, se analizó en primer lugar la respuesta de la cepa parental a la presencia de tolueno.

Resultados

Cuando se realizaron ensayos de quimiotaxis a tiempos cortos utilizando la técnica de la gota de agarosa (*Agarose Plug Assay*), se observó que las células de *Azoarcus* sp. CIB cultivadas anaeróbicamente en piruvato se aproximaban rápidamente a la gota de agarosa que contiene tolueno generando un halo refringente alrededor de dicha gota visible al microscopio de contraste de fases (Fig. 9A). Sin embargo, las células procedentes de un cultivo usando tolueno como fuente de carbono no generaron el halo refringente alrededor de la gota de agarosa conteniendo tolueno (Fig. 9B), lo que sugiere que la respuesta quimiotáctica es una respuesta de adaptación temporal a la aparición del compuesto aromático en el medio y requiere la generación de un gradiente de concentración de tolueno en el medio.

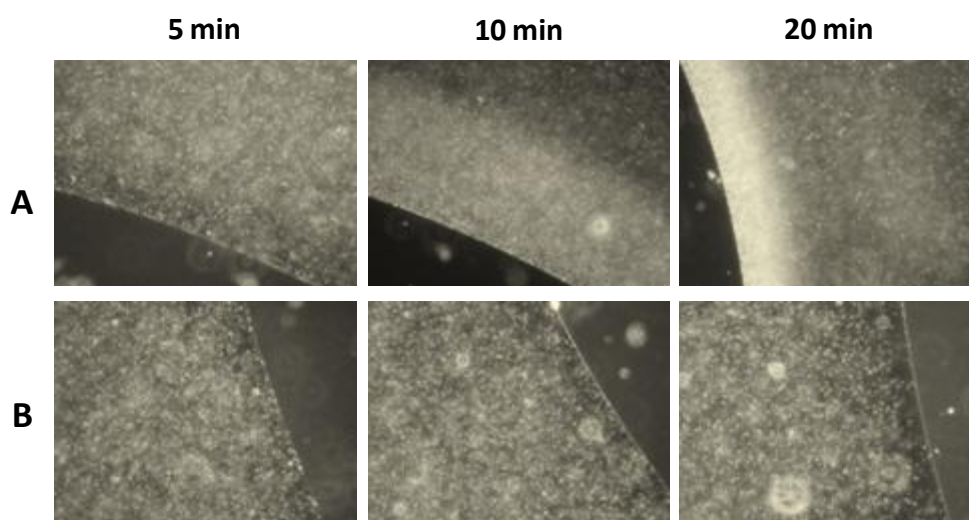


Figura 9. Quimiotaxis a tolueno de la cepa *Azoarcus* sp. CIB cultivada en piruvato o tolueno. Las células se cultivaron anaeróbicamente en medio MC con piruvato 0,2 % (A) o tolueno 1 mM (B) como fuente de carbono, y se sometieron al ensayo de *Agarose Plug Assay* con tolueno 1 mM como atrayente en la gota de agarosa según se detalla en el apartado 6.1 de Materiales y Métodos. Las fotografías se tomaron al microscopio de contraste de fases (x100 aumentos) al borde de la gota de agarosa a los 5, 10 y 20 min de ensayo. Se muestran los resultados de un experimento; resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.

Para determinar si la quimiotaxis era dependiente de la concentración de tolueno en la gota, se repitió el ensayo de quimiotaxis usando tolueno como atrayente a tres concentraciones, 1, 10 y 100 mM. Como se muestra en la figura 10, cuando la gota de agarosa contiene 1 mM de tolueno, las células rápidamente, tras 5 min, forman el halo refringente, mientras que cuando la concentración de tolueno utilizada es 10 veces

mayor, se necesita el doble de tiempo para empezar a ver el halo alrededor de la gota. Finalmente, cuando la gota de agarosa contiene una concentración de 100 mM de tolueno, se observa la formación del halo refringente, pero éste nunca llega al borde de la gota, probablemente debido a que se genera una zona en la que la alta concentración de tolueno es tóxica para las bacterias.

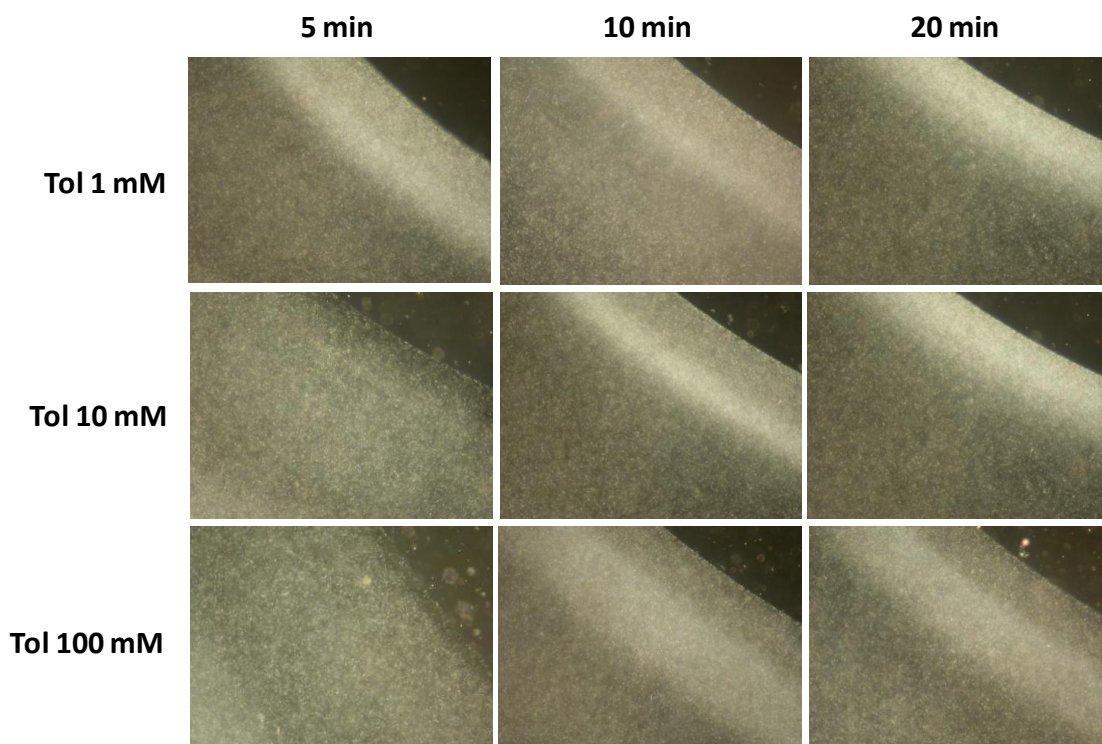


Figura 10. Quimiotaxis de *Azoarcus* sp. CIB a distintas concentraciones de tolueno. Las células se cultivaron anaeróbicamente en medio MC con piruvato 0,2 % como fuente de carbono y se sometieron al ensayo de *Agarose Plug Assay* con distintas concentraciones de tolueno (Tol) como atrayente en la gota de agarosa según se detalla en el apartado 6.1 de Materiales y Métodos. Las fotografías se tomaron al microscopio de contraste de fases (x100 aumentos) al borde de la gota de agarosa a los 5, 10 y 20 min de ensayo. Se muestran los resultados de un experimento; resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.

Para investigar si la quimiotaxis de *Azoarcus* sp. CIB a tolueno observada en anaerobiosis también tenía lugar en condiciones aeróbicas, se realizó un experimento en presencia de oxígeno. Como se muestra en la figura 11, no se observó la formación del halo refringente alrededor de la gota de agarosa con tolueno en presencia de

oxígeno. Estos resultados indican que la respuesta quimiotáctica de *Azoarcus* sp. CIB a tolueno a tiempos cortos sólo ocurre en anaerobiosis.

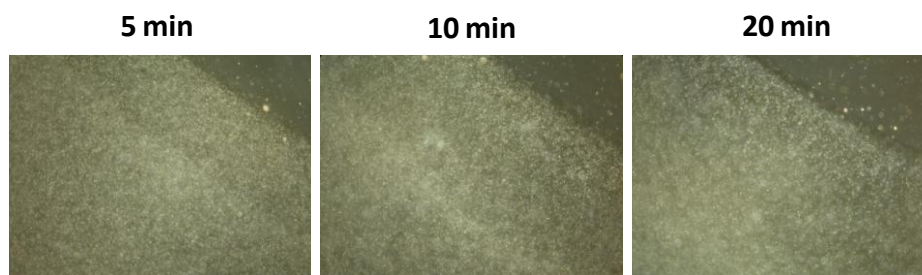


Figura 11. Respuesta quimiotáctica de *Azoarcus* sp. CIB a tolueno en presencia de oxígeno. Las células se cultivaron anaeróbicamente en medio MC con piruvato 0,2 % como fuente de carbono y se sometieron al ensayo de *Agarose Plug Assay* con tolueno 1 mM como atrayente en la gota de agarosa según se detalla en el apartado 6.1 de Materiales y Métodos. Las fotografías se tomaron al microscopio de contraste de fases (x100 aumentos) al borde de la gota de agarosa a los 5, 10 y 20 min de ensayo. Se muestran los resultados de un experimento; resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.

Para confirmar el papel del gen *tolR* en la respuesta quimiotáctica de *Azoarcus* sp. CIB, se realizaron ensayos de quimiotaxis en condiciones anaeróbicas frente a tolueno a distintos tiempos con la cepa parental *Azoarcus* sp. CIB, la cepa mutante *tolR* *Azoarcus* sp. CIB*dtolR* y la cepa mutante complementada con el plásmido pIZ*TolR* que expresa el gen *tolR* parental bajo el control del sistema regulador *lacI^q/Ptac*, *Azoarcus* sp. CIB*dtolR* (pIZ*TolR*) (Tabla 1).

Cuando se realizaron ensayos de quimiotaxis a tiempos cortos, y a diferencia de la cepa parental, la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB*dtolR* no mostró la formación de ningún halo refringente alrededor de la gota de agarosa con tolueno ni siquiera después de 20 min de contacto con el hidrocarburo (Fig. 12). Por el contrario, la cepa mutante complementada *Azoarcus* sp. CIB*dtolR*(pIZ*TolR*), revirtió el efecto de la mutación generando un halo refringente alrededor de la gota de agarosa que contiene tolueno incluso más rápidamente que la cepa parental CIB (Fig. 12).

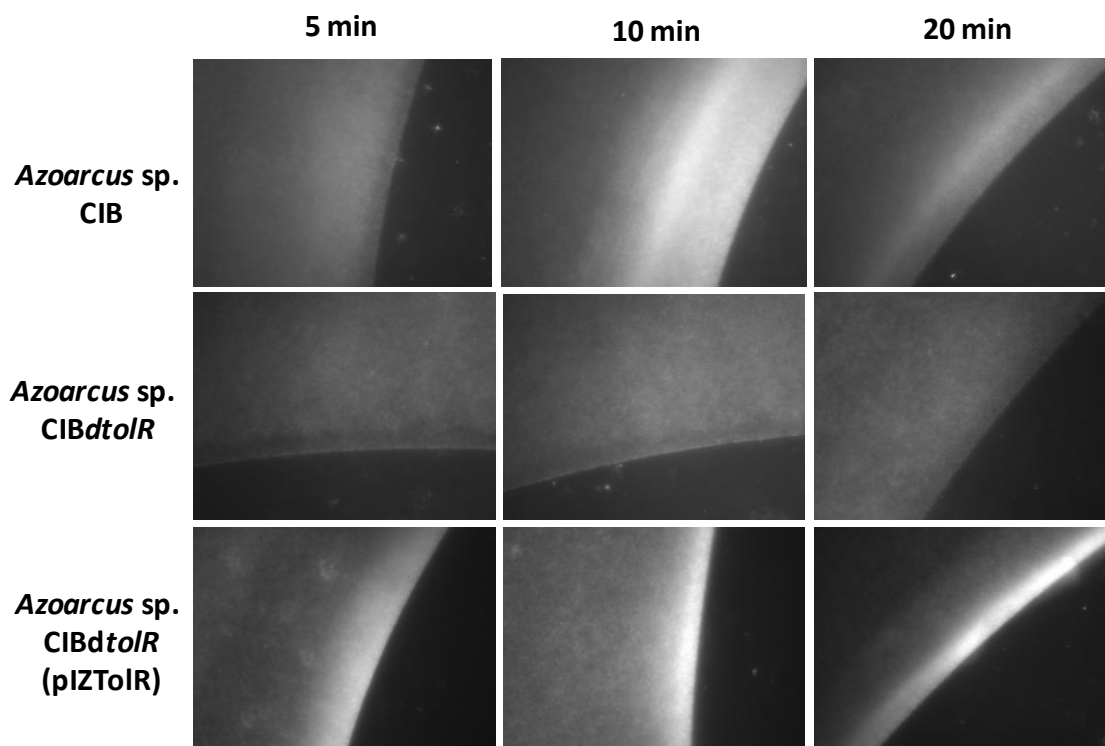


Figura 12. Quimiotaxis en medio líquido de las cepas *Azoarcus* sp. CIB, *Azoarcus* sp. CIB*dtolR* y *Azoarcus* sp. CIB*dtolR*(pIZ*TolR*). Las células se cultivaron anaeróbicamente en medio MC con piruvato 0,2 % como fuente de carbono y se sometieron al ensayo de *Agarose Plug Assay* con tolueno 1 mM como atrayente en la gota de agarosa según se indica en el apartado 6.1 de Materiales y Métodos. Las fotografías se tomaron al microscopio de contraste de fases (x100 aumentos) al borde de la gota de agarosa a los 5, 10 y 20 min de ensayo. Se muestran los resultados de un experimento; resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.

En ensayos de quimiotaxis a tiempos largos en placas de agar al 0,3 % con tolueno, se observaron halos de crecimiento significativamente mayores para la cepa parental *Azoarcus* sp. CIB que para la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB*dtolR* (Fig. 13), resultados que concuerdan con los obtenidos en el ensayo de la gota de agarosa. De nuevo, se confirmó que el defecto en quimiotaxis al tolueno del mutante *Azoarcus* sp. CIB*dtolR* podía ser revertido al introducir el gen *tolR* nativo como lo demuestra el comportamiento de la cepa mutante complementada *Azoarcus* sp. CIB*dtolR*(pIZ*TolR*) (Fig. 13).

En conjunto, estos resultados demuestran que la inactivación del gen *tolR* afecta a la respuesta quimiotáctica de *Azoarcus* sp. CIB al tolueno en anaerobiosis.

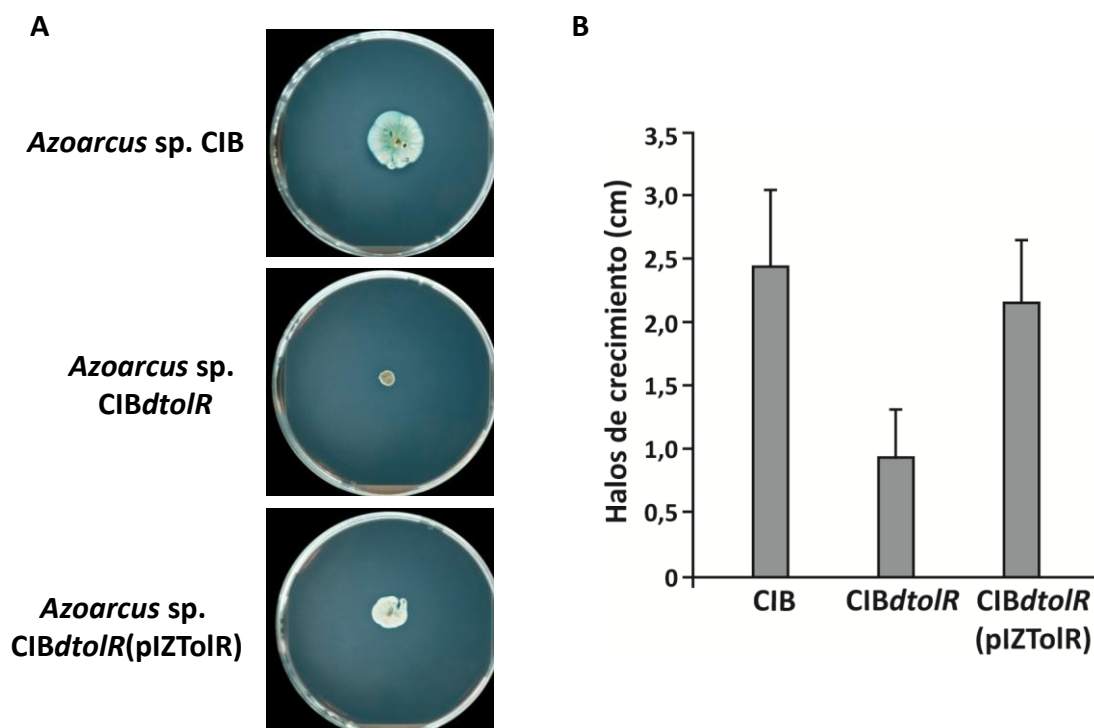


Figura 13. Quimiotaxis en placa de las cepas *Azoarcus* sp. CIB, *Azoarcus* sp. CIBdtolR y *Azoarcus* sp. CIBdtolR(pIZtolR). **A)** Imágenes de las placas de crecimiento anaeróbico tras 17 días de incubación en medio sólido MC con agar 0,3 % conteniendo piruvato 0,02 % y tolueno 1 mM como fuente de carbono, nitrato 10 mM e IPTG 5 mM, como se indica en el apartado 6.2 de Materiales y Métodos. **B)** Representación de las medidas de los diámetros de los halos de crecimiento tras 17 días de incubación anaeróbica. Las barras muestran la desviación estándar de los resultados de tres experimentos independientes.

1.2. El gen *tolR* no afecta a la movilidad general de *Azoarcus* sp. CIB en anaerobiosis.

La reducida quimiotaxis de la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIBdtolR frente al tolueno planteaba la duda de si el efecto observado podría deberse a que la mutación en el gen *tolR* pudiera afectar a la movilidad general de la cepa CIB en anaerobiosis. Para descartar esta hipótesis, se comprobó la respuesta quimiotáctica de las cepas *Azoarcus* sp. CIB y *Azoarcus* sp. CIBdtolR frente a otros compuestos tanto no aromáticos, e.g. piruvato (Fig. 14A), como aromáticos, e.g., benzoato (Fig. 14B). Como se deduce de los resultados obtenidos, de las dos cepas mostraron quimiotaxis positiva a las dos fuentes de carbono, siendo más acusada la de la cepa mutante en *tolR*.

Con los resultados mostrados, parece claro que el mutante *Azoarcus* sp. CIBdtolR no tiene alterada la maquinaria general de movilidad sugiriendo que el gen *tolR* controla específicamente la respuesta quimiotáctica de *Azoarcus* sp. CIB frente a hidrocarburos

aromáticos tales como el tolueno.

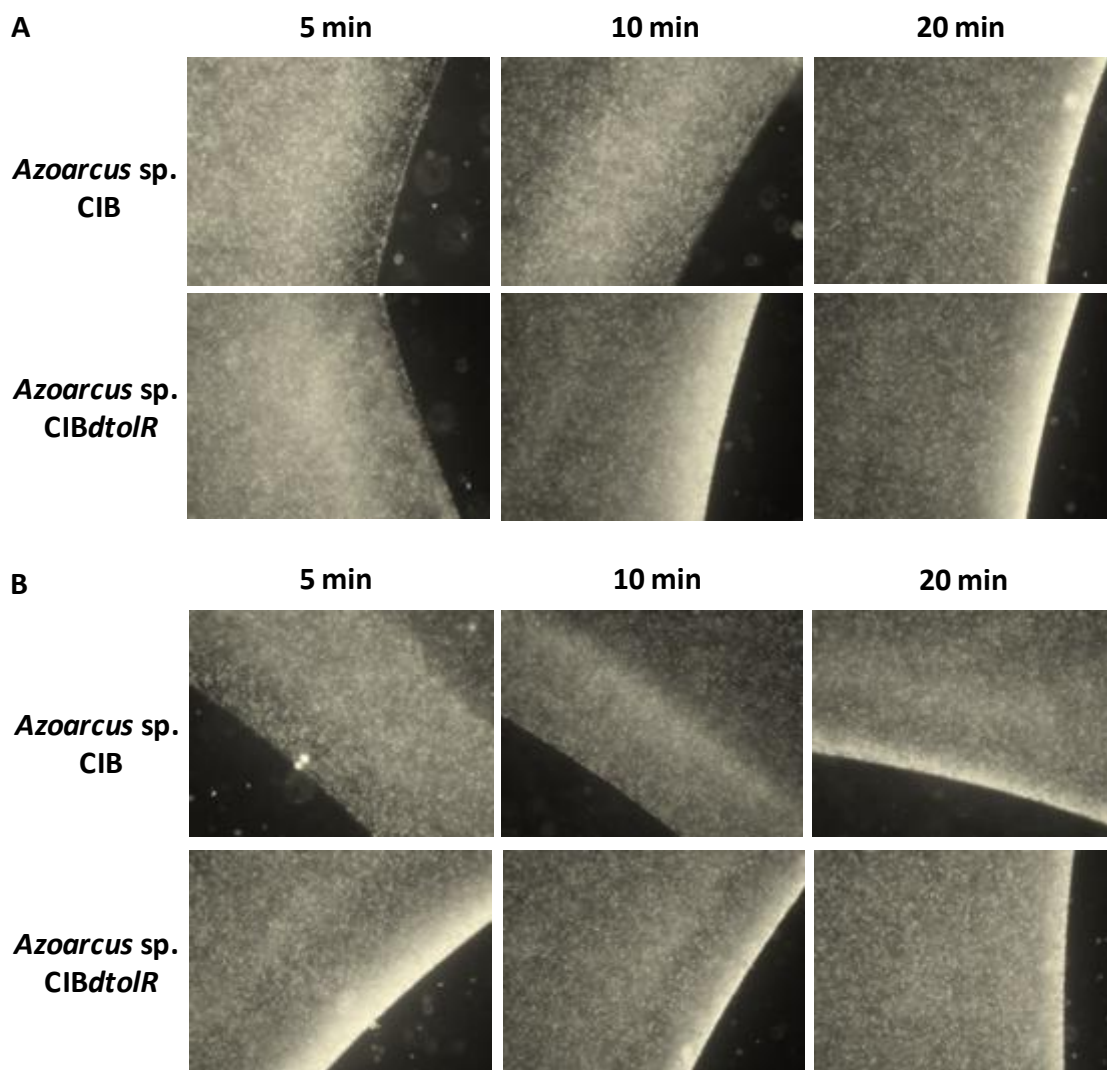


Figura 14. Respuesta quimiotáctica de las cepas *Azoarcus* sp. CIB y *Azoarcus* sp. CIBdtolR a ácidos orgánicos. Las células se cultivaron anaeróbicamente en medio MC con piruvato 0,2 % como fuente de carbono y se sometieron al ensayo de *Agarose Plug Assay* con piruvato 0,2 % (panel A) o benzoato 3 mM (panel B) como atrayentes según se indica en el apartado 6.1 de Materiales y Métodos. Las fotografías se tomaron al microscopio de contraste de fases (x100 aumentos) al borde de la gota de agarosa a los 5, 10 y 20 min de ensayo. Se muestran los resultados de un experimento; resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.

1.3. El gen *tolR* controla la quimiotaxis anaeróbica de *Azoarcus* sp. CIB a los hidrocarburos aromáticos.

Para determinar si el tolueno es el único hidrocarburo aromático hacia el que la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIBdtolR tiene afectada la quimiotaxis, se probaron otros hidrocarburos aromáticos como posibles atrayentes. Se seleccionó un hidrocarburo,

Resultados

m-xileno, que es fuente de carbono, y otro hidrocarburo, etilbenceno, que no es sustrato de crecimiento anaeróbico para la cepa CIB.

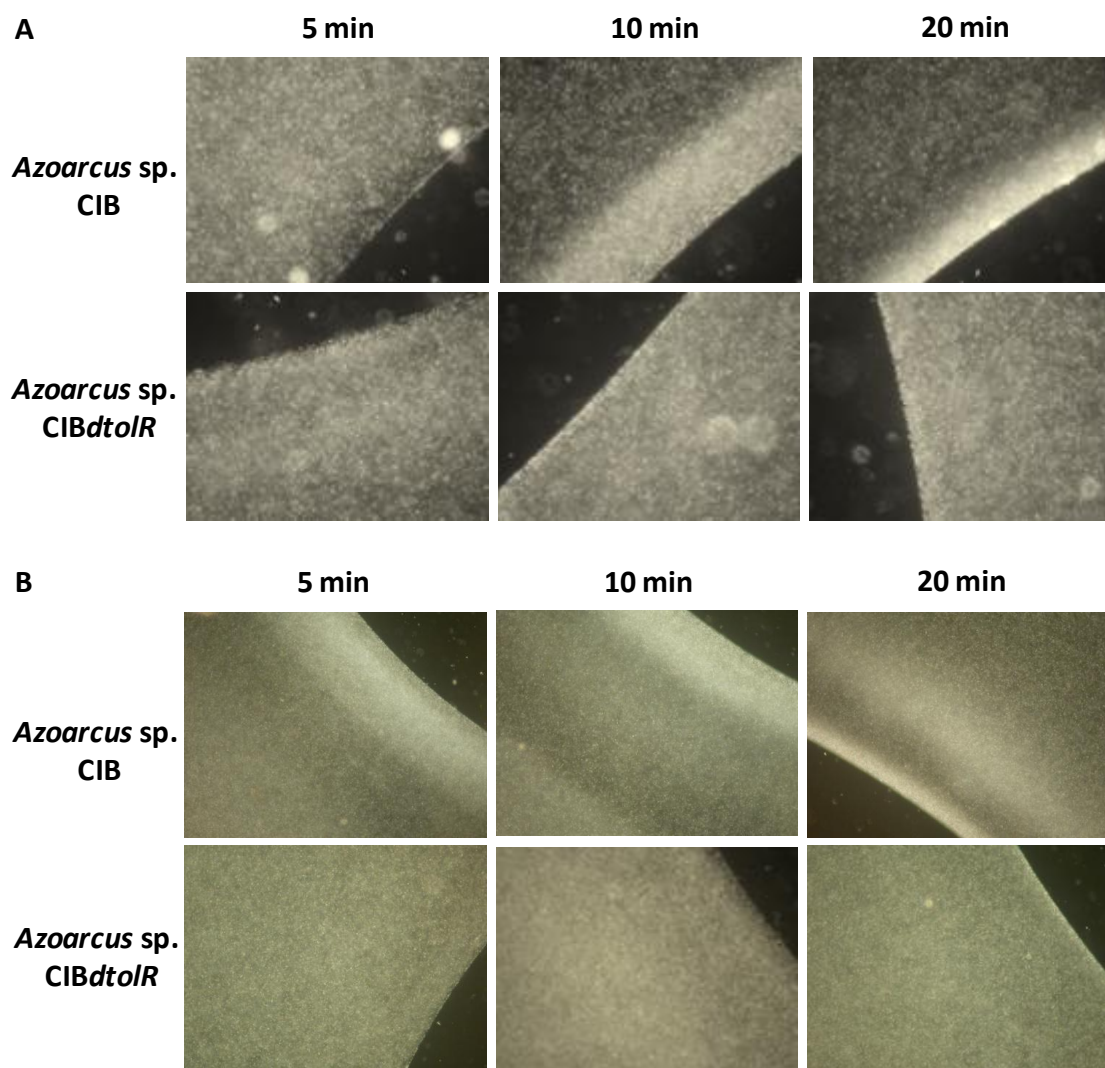


Figura 15. Respuesta quimiotáctica de las cepas *Azoarcus sp. CIB* y *Azoarcus sp. CIBdtolR* a distintos hidrocarburos aromáticos. Las células se cultivaron anaeróbicamente en medio MC con piruvato 0,2 % como fuente de carbono y se sometieron al ensayo de *Agarose Plug Assay* con *m*-xileno 1 mM (panel A) o etilbenceno 1 mM (panel B) como atrayentes según se indica en el apartado 6.1 de Materiales y Métodos. Las fotografías se tomaron al microscopio de contraste de fases (x100 aumentos) al borde de la gota de agarosa a los 5, 10 y 20 min de ensayo. Se muestran los resultados de un experimento; resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.

Cuando se realizó el ensayo de quimiotaxis por el método de la gota de agarosa que contenía 1 mM *m*-xileno (Fig. 15A) ó 1 mM etilbenceno (Fig. 15B), se observó el mismo efecto que con el tolueno (Fig. 12), es decir, la cepa parental genera un halo

refringente alrededor de la gota de agarosa con los dos compuestos analizados, mientras que la cepa mutante en el gen *tolR*, *Azoarcus* sp. CIB*dtolR*, posee una clara deficiencia en su respuesta quimiotáctica. Estos resultados demuestran la implicación del gen *tolR* en la quimiotaxis anaeróbica de la cepa CIB a tiempos cortos, e independiente del metabolismo del atrayente, frente a los hidrocarburos *m*-xileno y etilbenceno.

Para confirmar estos resultados, se realizó el ensayo de quimiotaxis en placas de agar al 0,3 % que contenían *m*-xileno, y se observó un halo de crecimiento significativamente mayor para la cepa parental *Azoarcus* sp. CIB que para la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB*dtolR* (Fig. 16). Asimismo, se observó que la complementación de la mutación con el gen *tolR* nativo revirtía en parte el defecto en quimiotaxis al *m*-xileno del mutante *Azoarcus* sp. CIB*dtolR*.

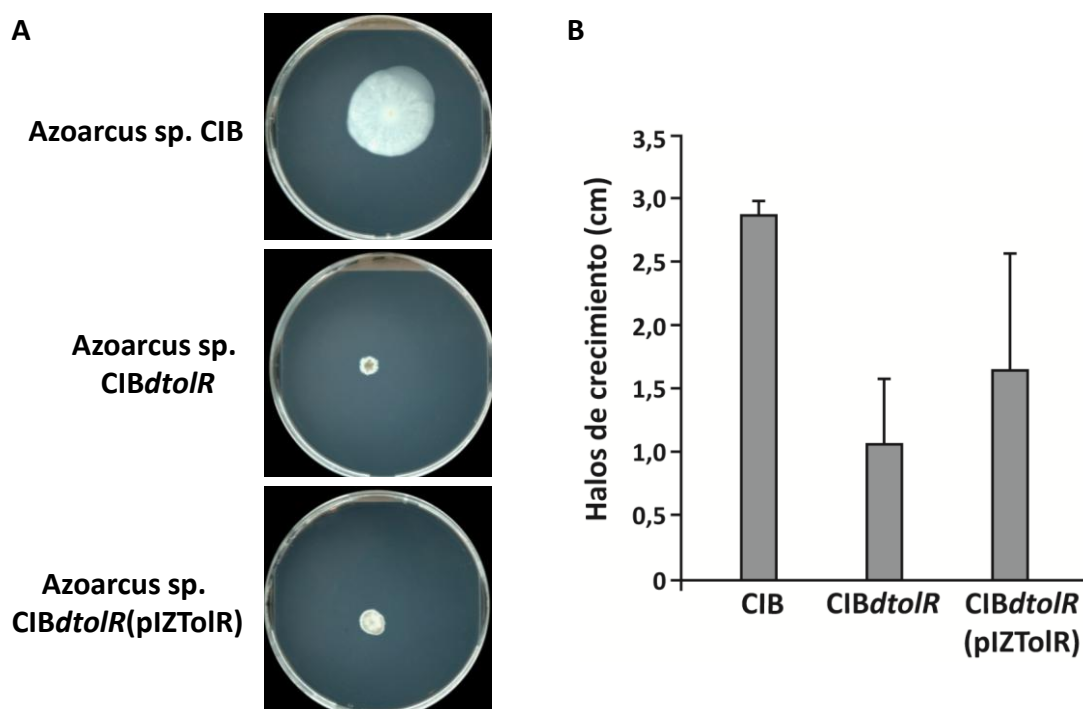


Figura 16. Quimiotaxis en placa de las cepas *Azoarcus* sp. CIB, *Azoarcus* sp. CIB*dtolR* y *Azoarcus* sp. CIB*dtolR*(pIZ*TolR*). Imágenes de las placas de crecimiento anaeróbico tras 17 días de incubación en medio sólido MC con agar 0,3 % conteniendo piruvato 0,0 2% y *m*-xileno 1 mM como fuente de carbono, nitrato 10 mM e IPTG 5 mM, como se indica en el apartado 6.2 de Materiales y Métodos.

Todos estos resultados demuestran que el gen *tolR* está implicado en la respuesta quimiotáctica de *Azoarcus* sp. CIB a los hidrocarburos aromáticos en condiciones anaeróbicas.

1.4. El gen *tolR* está implicado en la adaptación de *Azoarcus* sp. CIB a una exposición súbita a tolueno.

Una vez demostrada la implicación del gen *tolR* en la quimiotaxis de *Azoarcus* sp. CIB a los hidrocarburos aromáticos en anaerobiosis, se exploró su posible participación en otros mecanismos de adaptación de las células a la presencia de dichos hidrocarburos en el medio de cultivo. Para ello, se diseñó un experimento en el que se sometió a las células a la presencia de una concentración de tolueno de 20 mM, diez veces más alta de la que es capaz de tolerar como fuente de carbono en anaerobiosis, durante un periodo de tiempo de 2 h. Este tratamiento supone, por lo tanto, un claro estrés para la célula, lo que podría tener un reflejo en su viabilidad. Así, se realizaron ensayos de viabilidad celular en los que las 3 cepas, *Azoarcus* sp. CIB, *Azoarcus* sp. CIB*ΔtolR* y *Azoarcus* sp. CIB*ΔtolR*(pIZ*TolR*), se cultivaron anaeróbicamente hasta alcanzar la fase exponencial media y se sometieron a una exposición súbita de tolueno (choque de tolueno).

Como se muestra en la figura 17, mientras que la cepa parental CIB es capaz de sobrevivir al choque de tolueno, la inactivación del gen *tolR* genera una disminución en la viabilidad celular de más de un orden y medio de magnitud en la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB*ΔtolR*. Este efecto de pérdida de viabilidad se revierte cuando se complementa la mutación *tolR* con el plásmido pIZ*TolR* que codifica el gen *tolR* parental (Fig. 17).

Por tanto, la presencia de la proteína TolR en la cepa parental supone una ventaja adaptativa ante el estrés causado por una elevada concentración de tolueno en condiciones anaeróbicas. Por el contrario, la viabilidad tanto de la cepa parental como la del mutante *tolR* no se vio significativamente reducida tras un choque de tolueno en presencia de oxígeno (datos no mostrados), volviendo a confirmar el papel del gen *tolR* en la adaptación anaeróbica de *Azoarcus* sp. CIB a la presencia de hidrocarburos aromáticos.

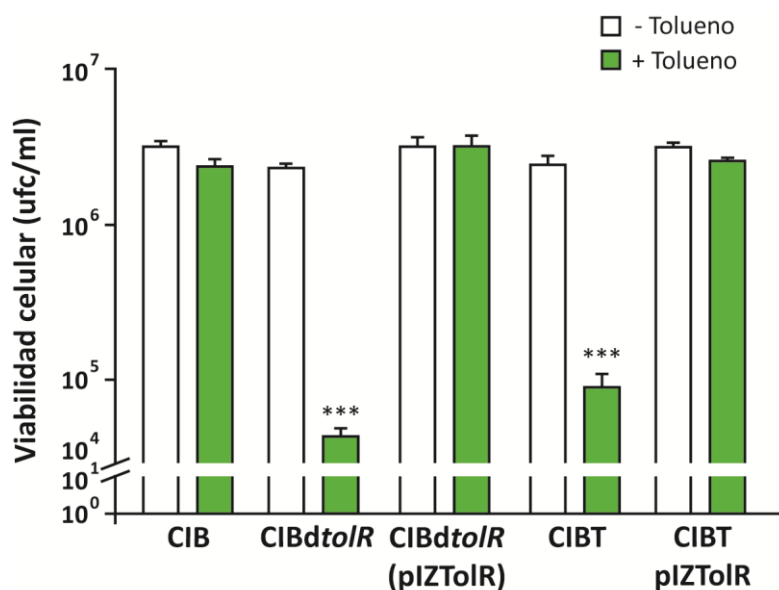


Figura 17. Efecto de la exposición súbita a una alta concentración de tolueno (choque de tolueno) en diferentes cepas de *Azoarcus*. Cuantificación de las unidades formadoras de colonias (ufc/ml) de las cepas *Azoarcus* sp. CIB, *Azoarcus* sp. CIBdtoIR (CIBdtoIR), *Azoarcus* sp. CIBdtoIR conteniendo el plásmido pIZtoIR (CIBdtoIR(pIZtoIR)), *Azoarcus* sp CIBT (CIBT) y *Azoarcus* sp CIBT conteniendo el plásmido pIZtoIR (CIBT(pIZtoIR)). Las células fueron cultivadas y tratadas con tolueno 20 mM (barras verdes) o sin exponer al choque de tolueno (barras blancas) como se describe en el apartado 5 de Materiales y Métodos. La viabilidad celular, expresada en unidades formadoras de colonias (ufc) por ml, se determinó plaqueando diluciones de las muestras en placas de medio MC succinato. Las barras muestran la desviación estándar de los resultados de tres experimentos independientes. Los asteriscos muestran la significancia usando el estadístico de análisis de varianza ANOVA y el test Student-Newman-Keuls: $P < 0,001$ (***).

Para determinar si la adaptación mediada por TolR está relacionada con el metabolismo del hidrocarburo aromático frente al que muestra la adaptación, se realizó el mismo protocolo experimental descrito anteriormente pero empleando una cepa disponible en el laboratorio, *Azoarcus* sp. CIBT (Tabla 1), que presenta una delección completa del *cluster bss-bbs* para la degradación anaeróbica de tolueno/*m*-xileno, incluyendo por tanto, al gen *tolR*. Como se muestra en la figura 17, la cepa que carece de la ruta periférica de degradación del tolueno, *Azoarcus* sp. CIBT, muestra una disminución en la viabilidad celular tras el choque de tolueno similar a la observada con la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIBdtoIR. Sin embargo, este efecto se revierte en la cepa *Azoarcus* sp. CIBT complementada con el plásmido pIZtoIR, como ocurre con la cepa *Azoarcus* sp. CIBdtoIR (pIZtoIR) (Fig. 17). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la adaptación mediada por TolR al efecto tóxico de los

hidrocarburos aromáticos no necesita de la capacidad de la cepa para degradar anaeróbicamente dicho hidrocarburo aromático.

En resumen, todos estos resultados demuestran que el gen *tolR* está implicado en la respuesta de *Azoarcus* sp. CIB al estrés causado por la exposición a una elevada concentración de hidrocarburos aromáticos en condiciones anaeróbicas.

2. Caracterización molecular de la proteína TolR.

Como se ha indicado en el apartado 5 de la Introducción, la proteína TolR podría codificar un sistema regulador de dos componentes híbrido (HTCS). El análisis de la estructura primaria de TolR evidencia la existencia de un supradominio N-terminal con alta identidad de secuencia con un dominio sensor PAS y un dominio autoquinasa (AK), y un supradominio C-terminal con alta identidad de secuencia con un regulador de respuesta con motivos implicados en el metabolismo del di-GMPc (Fig. 5; Anexo I). De ser así, TolR representaría el primer HTCS cuyo mecanismo de acción no implicaría una interacción directa con el DNA diana sino una actividad enzimática que modula los niveles del segundo mensajero di-GMPc. Análisis de comparación de secuencia de los dominios de TolR en distintas bases de datos, revelaron la existencia de unas pocas proteínas hipotéticas, no descritas en la bibliografía, que presentan una estructura similar a la de TolR, con la diferencia de que poseen dominios sensores entre el dominio REC y el dominio enzimático DGC. El funcionamiento de esta proteína podría implicar una cascada de fosforilación entre ambos supradominios con la intervención de los aminoácidos clave ya descritos para estos sistemas de transducción de señales, i.e., transferencia del fosfato del residuo de His conservado del dominio AK, al residuo Asp conservado del dominio REC, lo que finalmente produciría un cambio en los niveles del segundo mensajero celular di-GMPc. A continuación se detallan los experimentos realizados para dilucidar el mecanismo de acción de la proteína TolR.

2.1. TolR es una autoquinasa dependiente de tolueno.

2.1.1. Clonaje e hiperexpresión del gen *tolR* y purificación de la proteína TolR.

Con el objetivo de purificar la proteína TolR, se procedió a clonar el gen *tolR* en el vector de hiperexpresión pET29a, dando lugar al plásmido pETtolR (Fig. 18A), el cual

codifica un gen *tolR* recombinante que contiene una secuencia que codifica seis His en el extremo 3' y cuya expresión está bajo el control del promotor P_{T7} . El plásmido resultante se introdujo en la cepa hospedadora *E. coli* BL21 (DE3), que fue cultivada aeróbicamente en medio LB con IPTG para favorecer la hiperproducción de la proteína recombinante TolR. Puesto que la mayoría de la proteína producida se localizaba en la fracción insoluble, para optimizar la acumulación de la proteína TolR en la fracción soluble, se probaron distintas condiciones de temperatura, concentraciones de sales y tiempos de hiperproducción. Finalmente, se optimizó el proceso de purificación, estableciéndose el que se detalla en el apartado 8.2.1 de Materiales y Métodos. Como se puede apreciar en la figura 18B, se consigue obtener una proteína TolR parcialmente purificada con una masa molecular analizada en SDS-PAGE de aproximadamente 115 kDa, la cual coincide con la masa molecular teórica del monómero de la proteína (115297,1 Da).

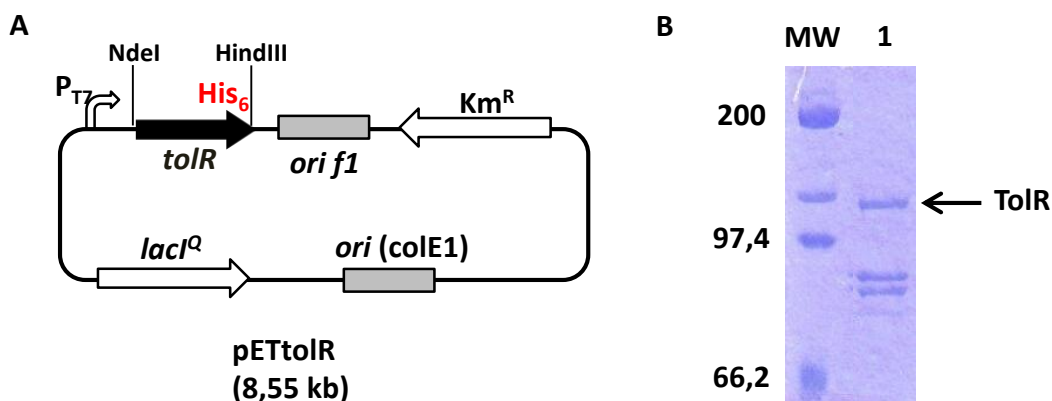


Figura 18. Clonaje e hiperproducción de la proteína TolR. A) Representación esquemática del plásmido pETtolR. El plásmido se construyó siguiendo la estrategia que se detalla en el apartado 3.7 de Materiales y Métodos. Se representa el promotor P_{T7} , el gen que confiere resistencia a la kanamicina (Km^R), los orígenes de replicación (*ori f1*, origen de replicación del bacteriófago f1; y *ori(ColE1)* origen de replicación ColE1) y el gen que codifica el represor LacI (*lacI^Q*). El extremo 3' del gen *tolR* recombinante con el tag de His se señala como His₆. Las dianas de restricción utilizadas para la clonaje se indican como: NdeI y HindIII. B) Proteína TolR-His₆ purificada de extractos de *E. coli* BL21 (DE3)(pETtolR). Gel SDS-PAGE (7,5 %) en el que se analizó la purificación parcial de la proteína TolR-His₆ mediante el método descrito en el apartado 8.2.1 de Materiales y métodos. Calle MW, marcadores de masa molecular cuyos tamaños se indican en el lado izquierdo de la imagen (en kDa). Calle 1, proteína TolR-His₆ (se señala con una flecha) parcialmente purificada.

2.1.2. TolR se fosforila *in vitro* de manera dependiente de tolueno.

Dado que el gen *tolR* se localiza en el *cluster bss-bbs* de degradación anaeróbica de tolueno, y puesto que el dominio PAS presente en la región N-terminal de TolR que

contiene el dominio autoquinasa presenta una alta identidad de secuencia con el dominiosensor PAS-1 que interacciona con tolueno y otros hidrocarburos aromáticos en la histidina-quinasa híbrida TodS (Busch y cols., 2007), se hipotetizó que la posible actividad autoquinasa de TolR podría responder a tolueno.

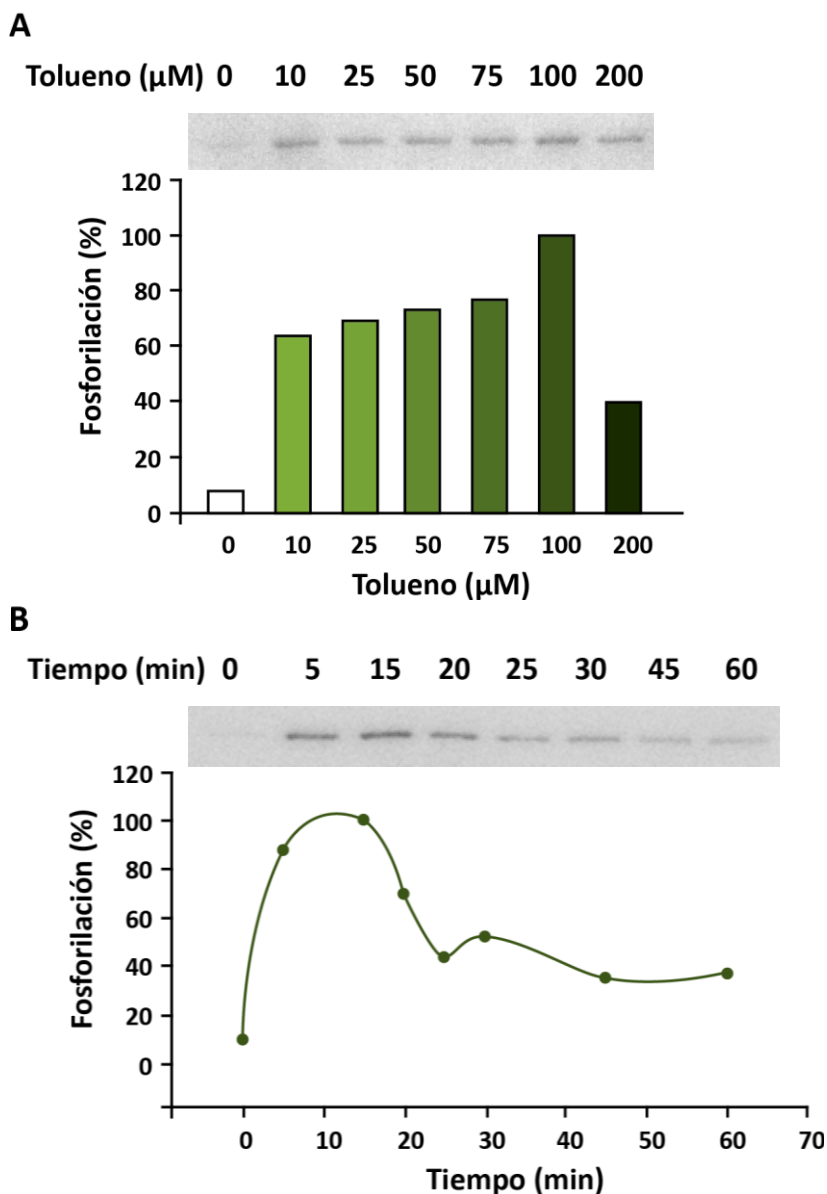


Figura 19. Autofosforilación *in vitro* de la proteína TolR. A) Fosforilación de TolR a distintas concentraciones de tolueno. La proteína TolR-His₆ (1 μM) fue incubada durante 15 min con γ -³²P-ATP en las condiciones de fosforilación *in vitro* que se indican en el apartado 9.2 de Materiales y Métodos, en presencia de concentraciones de 0, 10, 25, 50, 75, 100 y 200 μM de tolueno, y las muestras fueron analizadas mediante SDS-PAGE 7,5 %. **B) Cinética de la fosforilación de TolR.** La proteína TolR-His₆ (1 μM) fue incubada en presencia de γ -³²P-ATP y tolueno 100 μM . Se tomaron muestras a 0, 5, 15, 20, 25, 30, 45 y 60 min de incubación y éstas fueron analizadas mediante SDS-PAGE 7,5 %. En ambas gráficas se representa la intensidad de señal radiactiva, medida mediante densitometrado de las bandas de fosforilación, considerando 100 % la intensidad máxima obtenida en cada experimento.

Para confirmar experimentalmente la presunta actividad autoquinasa de TolR dependiente de tolueno, se diseñó un ensayo de fosforilación *in vitro* con la proteína TolR purificada incubándola en presencia de γ - 32 P-ATP con distintas concentraciones de tolueno, y se monitorizó la incorporación del fosfato radiactivo mediante análisis en SDS-PAGE.

Como se observa en la figura 19A, TolR se fosforila *in vitro* y al aumentar la concentración de tolueno, aumenta el porcentaje de fosforilación de TolR de una manera dosis-dependiente, alcanzando el máximo nivel de fosforilación a la concentración de 100 μ M de tolueno. La fosforilación basal de TolR es inferior al 20 % de la máxima observada. Se concluye así que la molécula de tolueno actúa como inductor de la actividad quinasa de TolR. Del mismo modo, en la figura 19B se observa que el porcentaje de fosforilación aumentó proporcionalmente con el tiempo del ensayo, alcanzando niveles máximos de fosforilación de los 5 a los 15 min de reacción, y reduciéndose a tan sólo el 40 % tras 25 min. Estos resultados confirmaron que la proteína TolR posee la capacidad de fosforilarse *in vitro* en presencia de ATP con una actividad basal que se ve aumentada unas 5 veces en presencia de tolueno.

2.1.3. El residuo His¹⁹⁰ es esencial para la actividad autoquinasa de TolR.

El residuo His¹⁹⁰ de la proteína TolR está altamente conservado en los correspondientes dominios DHp de las histidina quinasa sensoras bacterianas (Fig. 2), y el análisis de comparación de secuencias sugiere que se trata del residuo clave para la reacción de autofosforilación (Stock y cols., 2000, 2010; Laub y cols., 2007). Con el objetivo de comprobar experimentalmente la función del residuo His¹⁹⁰ de TolR, se diseñó la proteína TolR^{H190V}, un mutante en la presunta His catalítica del dominio AK que se sustituyó por una Val mediante un protocolo de mutagénesis dirigida. El plásmido de hiperexpresión pETtolR^{H190V} codifica un gen *tolR*^{H190V} recombinante que fusiona una secuencia que codifica seis His en su extremo 3' y cuya expresión se encuentra bajo el control del promotor P_{T7} . El plásmido resultante (Fig. 20A) se introdujo en la cepa hospedadora *E. coli* BL21 (DE3), que fue cultivada aeróbicamente en medio LB con IPTG para favorecer la hiperproducción de la proteína recombinante TolR^{H190V}. El proceso seguido para la purificación de la proteína TolR^{H190V} fue el mismo que el empleado para purificar la proteína parental (ver apartado 8.2.1 de Materiales y

Resultados

Métodos), lo que permitió obtener la proteína parcialmente purificada como se muestra en la figura 20B. Cuando se realizaron ensayos de fosforilación *in vitro* de TolR^{H190V} tanto en presencia como en ausencia de tolueno, no se observó la banda correspondiente a la proteína fosforilada (Fig. 20C), confirmando el carácter esencial de este aminoácido en la actividad autoquinasa de la proteína TolR.

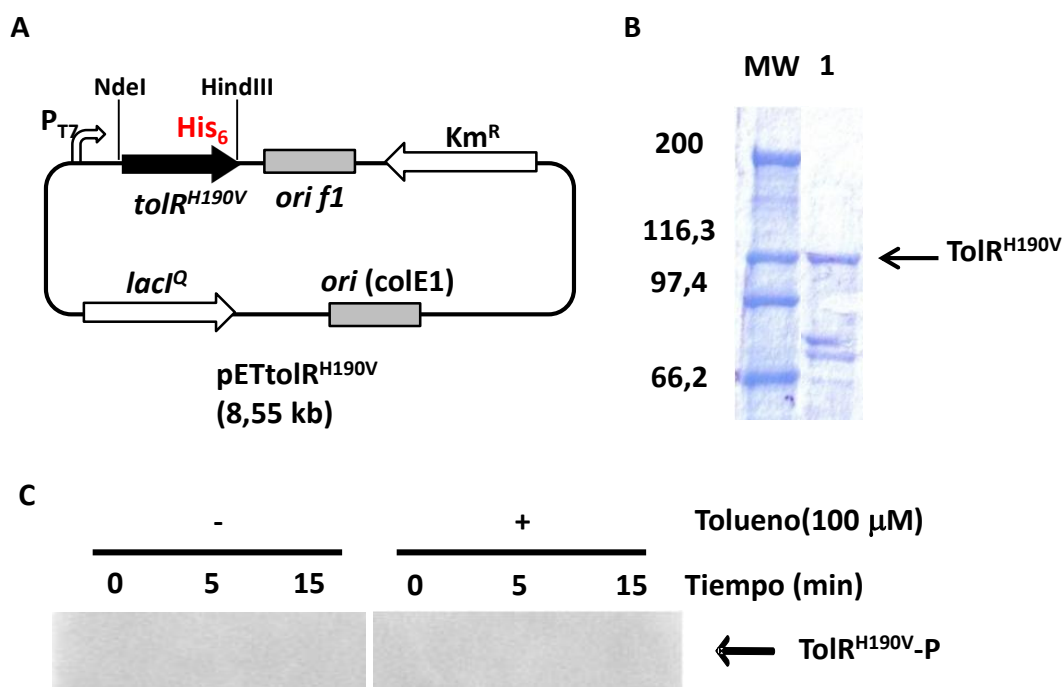


Figura 20. Construcción, purificación y ensayo autoquinasa de la proteína TolR^{H190V}. **A) Representación esquemática del plásmido pETtolR^{H190V}.** El plásmido se construyó siguiendo la estrategia que se detalla en el apartado 3.7 de Materiales y Métodos. Se representa el promotor P_{T7}, el gen que confiere resistencia a la kanamicina (Km^R), los orígenes de replicación (*ori f1*, origen de replicación del bacteriófago f1; y *ori(ColE1)* origen de replicación ColE1) y el gen que codifica el represor LacI (*lacI*^Q). El extremo 3' del gen *tolR* recombinante con el *tag* de His se señala como His₆. Las dianas de restricción utilizadas para la clonaje se indican como: NdeI y HindIII. **B) Proteína TolR^{H190V} parcialmente purificada de extractos de *E. coli* BL21 (DE3)(pETtolR^{H190V}).** Gel SDS-PAGE (7,5 %) en el que se analizó la proteína purificada mediante el método descrito en la sección 8.2.1 de Materiales y métodos. Calle MW, marcadores de masa molecular cuyos tamaños se indican en el lado izquierdo de la imagen (en kDa). Calle 1, proteína TolR^{H190V} (se señala con una flecha) parcialmente purificada. **C) Autofosforilación de la proteína TolR^{H190V}.** La proteína TolR^{H190V}-His₆ (1 μM) fue incubada con γ-³²P-ATP en ausencia (-) o en presencia (+) de tolueno 100 μM en las condiciones de fosforilación *in vitro* que se indican en el apartado 9.2 de Materiales y Métodos. Se tomaron muestras a los 0, 5 y 15 min, y éstas fueron analizadas mediante SDS-PAGE 7,5 %. Se indica con una flecha la posición donde debería aparecer, en el caso de que pudiese autofosforilarse, la proteína TolR^{H190V} fosforilada.

2.1.4. Estudio del rango de efectores de TolR.

Demostrado el efecto activador del tolueno en la fosforilación del dominio autoquinasa de TolR (Fig. 19 y 20), se procedió a estudiar el posible efecto activador de otros compuestos con el fin de establecer el rango de inductores y los determinantes estructurales necesarios para el reconocimiento de estos compuestos por la proteína TolR. Se probó un amplio rango de compuestos tanto aromáticos, tales como benceno, estireno, cumeno, bifenilo, propilbenceno, *orto* (*o*), *meta* (*m*) y *para* (*p*)-xileno, etilbenceno, mesitileno, benzoato, benzaldehído, bencilamina, bencil alcohol, fenol, anilina, acetofenona, como no aromáticos, tales como el hexano, heptano, octanol, decano o ciclohexano, a dos concentraciones diferentes, 100 y 500 μ M.

Como se muestra en la figura 21, una serie de compuestos, aromáticos tales como el *o*-xileno y anilina, eran capaces de inducir la fosforilación de TolR con una eficiencia similar a la del tolueno (Fig. 21A). Sin embargo, la mayoría de los compuestos ensayados mostraban una inducción inferior a la del tolueno (Fig. 21B y 21C). Curiosamente, algunos compuestos no aromáticos, como el hexano y el ciclohexano, demostraron ser inductores de TolR (Fig. 21C), mientras que compuestos aromáticos como el benzoato o el cumeno no fueron capaces de inducir la fosforilación de TolR (Fig. 21).

Estos resultados en conjunto permiten sugerir que el bolsillo de reconocimiento de efector de TolR admite una amplia variedad de compuestos aromáticos agonistas (capaces de inducir la actividad autoquinasa) con una o dos sustituciones del anillo pero no compuestos con sustituciones carboxílicas (benzoato), grupos alquilo ramificados (cumeno) o compuestos con tres o más sustituciones en el anillo aromático (mesitileno); además, ciertos alcanos alifáticos (hexano) y alicíclicos (ciclohexano) son capaces de reconocer el bolsillo de TolR y funcionar como moléculas efectoras.

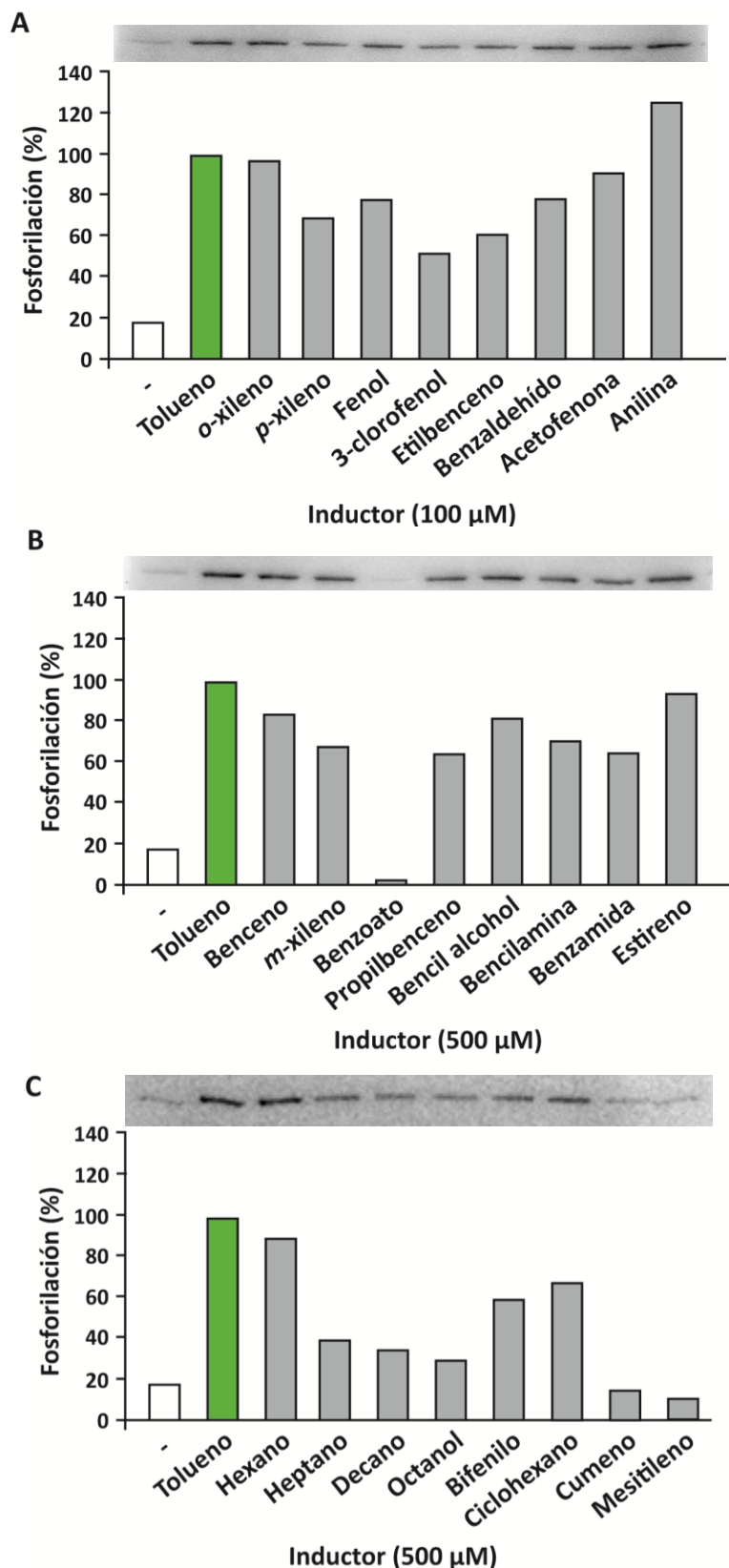


Figura 21. Estudio del rango de inductores de TolR. La proteína TolR-His₆ (1 μ M) fue incubada en presencia de γ -³²P-ATP en las condiciones de fosforilación *in vitro* que se indican en el apartado 9.2 de Materiales y Métodos. Se tomaron muestras a los 15 min de reacción en presencia de los distintos compuestos detallados en la figura usando una concentración de 100 μ M (panel A) o 500 μ M (paneles B y C). En todos los casos el tolueno se utilizó a una concentración de 100 μ M.

Utilizando el servidor i-TASSER que construye modelos tridimensionales basados en alineamientos múltiples y simulaciones de ensamblajes iterativos de fragmentos a partir de modelos, se generó un modelo tridimensional del dominio PAS de TolR (Fig. 22). Como cabría esperar, el dominio PAS de TolR presenta la típica estructura 2β - 4α - 3β , característica de los dominios PAS (Figs. 22A y 22B; Hefti y cols., 2004). Realizando experimentos de *docking* ciego con varios inductores (agonistas), se observó que en todos los casos la interacción del efector con el dominio PAS tenía lugar en una región concreta de dicho dominio con un entorno hidrofóbico en el que destacan los aminoácidos Phe⁴⁶, Val⁴⁷, Gly⁴⁸, Ile⁵⁶, Ile⁵⁹, Ala⁶³, Phe⁷⁹, Phe¹²⁸, Pro¹⁴⁵ y Gly¹⁴⁷ (Fig. 22), la mayoría de los cuales, incluyendo a los residuos esenciales Phe⁴⁶ y Phe⁷⁹ cuya mutación genera proteínas con menor capacidad de reconocimiento de inductor (Busch y cols., 2007), se encuentran conservados en el bolsillo del dominio PAS-1 de TodS y en los dominios PAS de otras HK híbridas, e.g. TutC y TmoS, que reconocen hidrocarburos aromáticos (Fig. 30). Cabe destacar que cuando se realizó el *docking* con benzoato, un compuesto no inductor, no fue posible predecir una interacción con el bolsillo de reconocimiento de inductores, muy posiblemente debido al carácter polar del benzoato, y sí en una localización diferente del dominio PAS de TolR (Fig. 22D). Asimismo, se comprobó que el cumeno, que no es un efector positivo de TolR, se localiza en el bolsillo de reconocimiento de inductores pero desplazado hacia el exterior del bolsillo, lo que impide una correcta interacción con el mismo (Fig. 22E). En conclusión, estos resultados permiten hipotetizar que el dominio sensor PAS de TolR posee un único bolsillo de reconocimiento de efectores que es capaz de acomodar una gran variedad de compuestos agonistas diferentes, al igual que ocurre con el dominio PAS-1 de TodS (Lacal y cols., 2006; Busch y cols., 2007). Por el contrario, compuestos aromáticos muy polares, como el benzoato, no parecen ser capaces de interaccionar con el bolsillo del dominio PAS, mientras que compuestos aromáticos voluminosos, como el cumeno, sí serían capaces de interaccionar pero sin establecer las interacciones correctas que permitan inducir un cambio conformacional compatible con el incremento de la actividad autoquinasa. Si estos compuestos actúan como antagonistas del efecto inductor de los agonistas, como se ha descrito en TodS con el *o*-xileno (Busch y cols., 2007), es algo que necesita confirmación experimental futura.

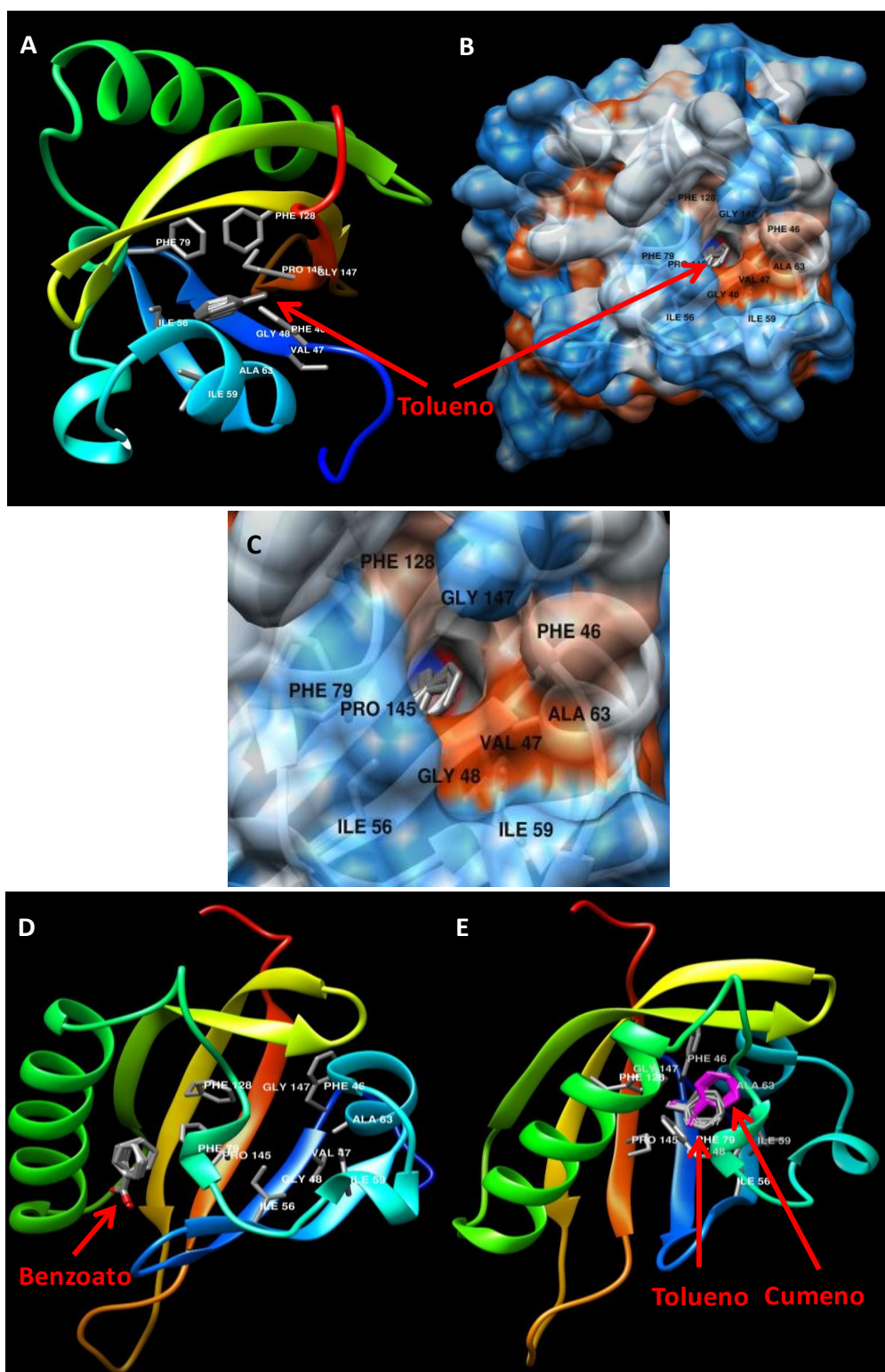


Figura 22. Modelo tridimensional del dominio sensor PAS de TolR interaccionando con distintos compuestos aromáticos. Se muestran los modelos de interacción de las moléculas de tolueno (en gris) (A, B, C y E), benzoato (en gris) (D) y cumeno (en rosa) (E) con el dominio PAS (aminoácidos 40-154) de la proteína TolR generados con el programa AutoDocking. En el panel E, se incluyen las moléculas de tolueno y cumeno para mostrar más claramente el desplazamiento del cumeno en el bolsillo. Se muestran los aminoácidos propuestos para el bolsillo de reconocimiento de efector (Phe⁴⁶, Val⁴⁷, Gly⁴⁸, Ile⁵⁶, Ile⁵⁹, Ala⁶³, Phe⁷⁹, Phe¹²⁸, Pro¹⁴⁵ y Gly¹⁴⁷). El panel C es una ampliación del bolsillo mostrado en B.

2.2. TolR es una histidina quinasa que cataliza la transferencia intramolecular de fosfato.

Para confirmar que TolR es un HTCS en donde el componente autoquinasa sensor transfiere el grupo fosfato al componente regulador de respuesta efector localizado en la misma molécula, era necesario demostrar la cascada de fosforilación intramolecular entre el dominio autoquinasa (residuo His¹⁹⁰ del dominio AK) y el dominio *receiver* (residuo conservado Asp⁴⁹⁹ del dominio REC) (Fig. 5). Para ello, se diseñó un experimento de fosforilación *in vitro* que permite diferenciar el fosfato unido a cada uno de los aminoácidos mencionados, basándose en la distinta estabilidad de dichos enlaces. En un entorno básico se estabiliza el enlace del grupo fosfato a la His del dominio AK, mientras que en un entorno ácido, se estabiliza el enlace del grupo fosfato al Asp del dominio REC (Burbulys, 1991).

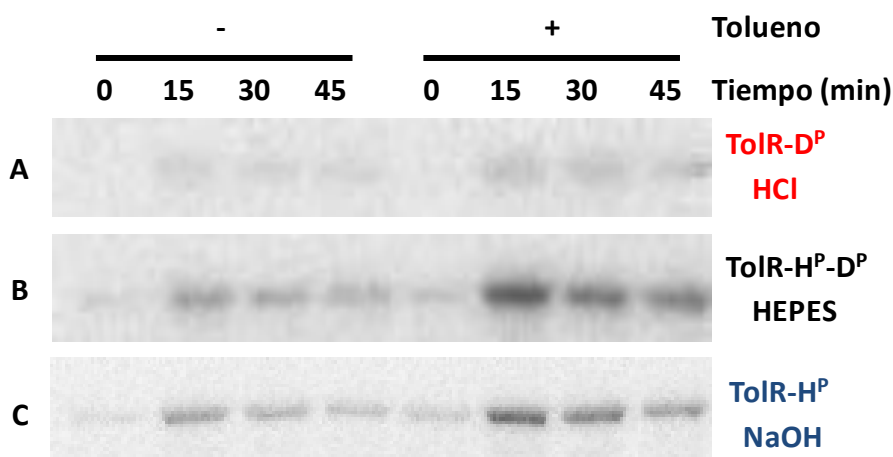


Figura 23. Monitorización de la transferencia intramolecular de fosfato en la proteína TolR. La proteína TolR-His₆ (1 μM) fue incubada con γ-³²P-ATP en ausencia (-) o en presencia (+) de tolueno 100 μM como se indica en el apartado 9.2 de Materiales y Métodos. Se tomaron muestras a los 0, 15, 30 y 45 min de incubación y éstas fueron analizadas mediante SDS-PAGE 7,5 %. Geles idénticos se trataron con HCl (panel A), Tampón HEPES pH 7 (panel B, control) o NaOH (panel C) como se describe en el apartado 9.3 de Materiales y Métodos.

Como se observa en la figura 23, tanto en ausencia como en presencia de tolueno, se aprecia proteína TolR fosforilada en la His (Fig. 23C), que da cuenta de la reacción de autofosforilación, y en el Asp (Fig. 23A), que da cuenta de la reacción de transferencia de fosfato. En presencia del inductor tolueno la reacción de autofosforilación está significativamente incrementada (Fig. 23C). Estos resultados refuerzan la hipótesis de

que TolR es un HTCS capaz de transferir intramolecularmente el grupo fosfato del dominio autoquinasa al dominio *receiver*, y sugieren que el efecto activador del tolueno afecta principalmente a la actividad autoquinasa.

2.3. TolR es una fosfodiesterasa de di-GMPc activa en condiciones anaeróbicas.

Como ya se ha comentado en la Introducción (apartado 5), el análisis de la estructura primaria de TolR reveló la presencia de un dominio DGC y un dominio PDE, dominios presuntamente implicados en la síntesis y degradación del di-GMPc respectivamente (Römling y cols., 2013), en la región C-terminal de la proteína. Un análisis detallado de la secuencia del dominio DGC reveló que el motivo consenso GGDEF, está sustituido por el motivo degenerado GDREF (Blázquez, 2009). Sustituciones similares generan DGC inactivas (Christen y cols., 2005). Por el contrario, la PDE contiene el motivo conservado (EAL), lo que sugería la existencia de actividad PDE de di-GMPc en la proteína TolR.

Para poner en evidencia la posible actividad PDE de di-GMPc de la proteína TolR, se procedió a comprobar su papel en alguno de los procesos en los que está implicado el di-GMPc, como es la formación de biopelículas (Römling y cols., 2005, 2013). Para ello se utilizó la cepa *E. coli* TRMG (Tabla 1), que posee una inactivación del regulador global *csrA* implicado, entre otras funciones, en la regulación negativa de DGCs responsables de la síntesis de di-GMPc. Por tanto, la cepa mutante *E. coli* TRMG posee niveles elevados de di-GMPc y, por ello, presenta un significativo incremento en su capacidad de formar biopelículas respecto a la cepa parental (Romeo y cols., 1993).

Para confirmar la actividad fosfodiesterasa de di-GMPc de TolR, se utilizó el plásmido pIZTolR que expresa el gen *tolR* (Tabla 2). Asimismo, utilizando el plásmido pIZ1016 se construyeron los plásmidos pIZTolR^{H190V} (Tabla 2; Fig. 24A) el cual expresa bajo el control del promotor *Ptac* el gen *tolR*^{H190V} que codifica una proteína TolR incapaz de autofosforilarse (Fig. 20), y pIZ2133 (Tabla 2), el cual expresa bajo el control del promotor *Ptac* el gen *PA2133* de *P. aeruginosa* PAO1 que codifica una fosfodiesterasa de di-GMPc previamente caracterizada (Hickman y cols., 2005) y que sirve como control positivo de actividad PDE (Fig. 24B).

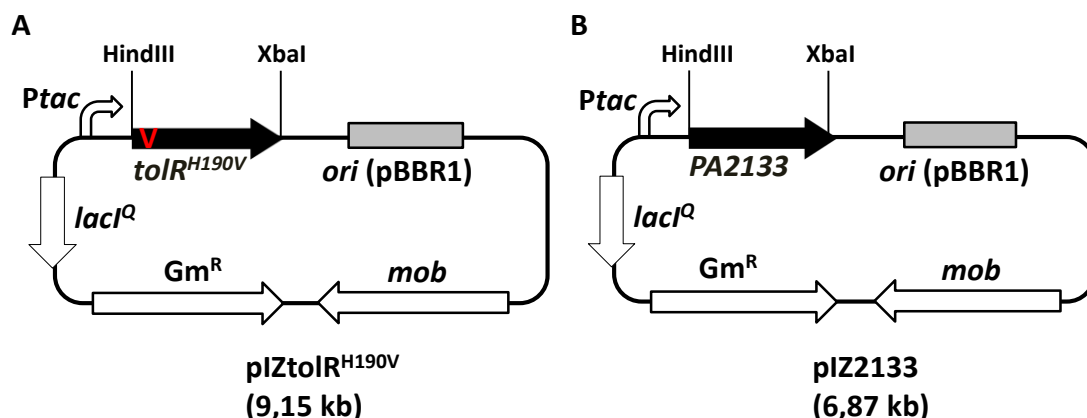


Figura 24. Representación esquemática de los plásmidos pIZtolR^{H190V} (A) y pIZ2133 (B). Los plásmidos se construyeron siguiendo el protocolo que se detalla en el apartado 3.6 de Materiales y Métodos. Se representa el origen de replicación (*ori*pBBR1), la región de movilización (*mob*) y el gen que codifica la resistencia a gentamicina (*Gm^R*) del plásmido pIZ1016 y sus derivados. Se representa con una flecha curvada blanca el promotor *Ptac*. *lacI^Q*, gen que codifica el represor LacI. Las dianas de restricción utilizadas para el clonaje de los genes *tolR^{H190V}* y *PA2133* se indican como *HindIII* y *XbaI*.

Se transfirieron por electroporación los plásmidos a la cepa mutante *E. coli* TRMG, y se analizó la capacidad de formación de biopelículas de las cepas resultantes *E. coli* TRMG (pIZ1016), *E. coli* TRMG (pIZtolR), *E. coli* TRMG (pIZtolR^{H190V}) y *E. coli* TRMG (pIZ2133) tanto en condiciones de crecimiento anaeróbicas como aeróbicas. Se observó que en condiciones anaeróbicas la cepa complementada con el gen *tolR* mostraba una significativa menor capacidad de formación de biopelículas que la cepa control conteniendo el plásmido pIZ1016 (Fig. 25), y una disminución similar a la observada con la cepa complementada con la fosfodiesterasa control PA2133. Por el contrario, en condiciones aeróbicas la presencia del gen *tolR* no se traduce en una disminución de la formación de biopelículas de la cepa reportera *E. coli* TRMG, lo que sí ocurre con la fosfodiesterasa control PA2133 que no es dependiente de oxígeno. La sustitución del residuo catalítico His¹⁹⁰ a Val en TolR no permite reducir la formación de biopelículas de la cepa complementada *E. coli* TRMG (pIZtolR^{H190V}) (Fig. 25), sugiriendo que el gen *tolR* es capaz de disminuir los niveles de di-GMPc en *E. coli* TRMG siempre y cuando la actividad quinasa de TolR esté funcional. En conclusión, el abordaje *in vivo* realizado sugiere que TolR es una fosfodiesterasa de di-GMPc activa en condiciones anaeróbicas y que requiere la fosforilación del dominio sensor autoquinasa para su activación.

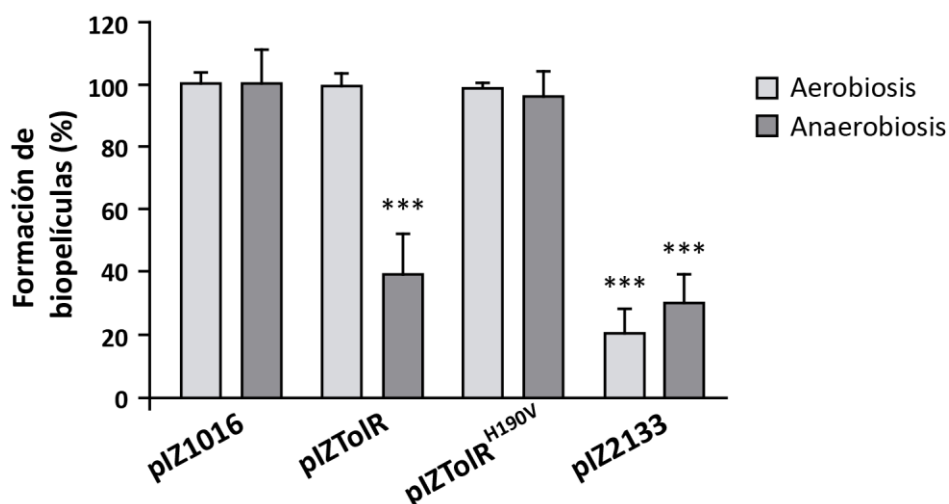


Figura 25. Formación de biopelículas por las cepas *E. coli* TRMG (pIZ1016), *E. coli* TRMG(pIZToIR), *E. coli* TRMG(pIZToIR^{H190V}) y *E. coli* TRMG(pIZ2133). La formación de biopelículas se midió mediante tinción con cristal violeta y posterior cuantificación de la absorbancia a 595nm según se detalla en el apartado 7 de Materiales y Métodos. Las células fueron cultivadas aeróbica ó anaeróbicamente en medio CFA con IPTG 1 mM a 30°C durante 16 h en placas multipocillo. Las barras muestran la desviación estándar de los resultados de tres experimentos independientes. Los asteriscos muestran la significancia usando el estadístico de análisis de varianza ANOVA y el test Student-Newman-Keuls: $P < 0,001$.

Con el fin de demostrar *in vitro* la actividad fosfodiesterasa de la proteína TolR, se procedió a realizar un ensayo enzimático con el compuesto bis-*p*-nitrofenilfosfato, que ha sido empleado para detectar esta actividad en otras fosfodiesterasas de di-GMPc (Bobrov y cols., 2005).

Para ello se transfirieron por electroporación los plásmidos pIZ1016, pIZToIR y pIZ2133 a la cepa *E. coli* DH10B, y se analizó la actividad PDE presente en los extractos celulares de cada cepa. Se observó que el extracto de la cepa complementada con el gen *tolR* (Fig. 26A) mostraba una actividad (aproximadamente 0.006 Δ Abs/min/mg proteína) similar a la de la cepa complementada con la fosfodiesterasa control PA2133 (Fig. 26B). Además, como era de esperar, se observó que en los dos casos al aumentar la concentración de proteína en el ensayo, aumentaba la actividad total detectada.

Estos resultados indican, de nuevo, que TolR posee actividad PDE y sugieren que se trata de una enzima que hidroliza di-GMPc.

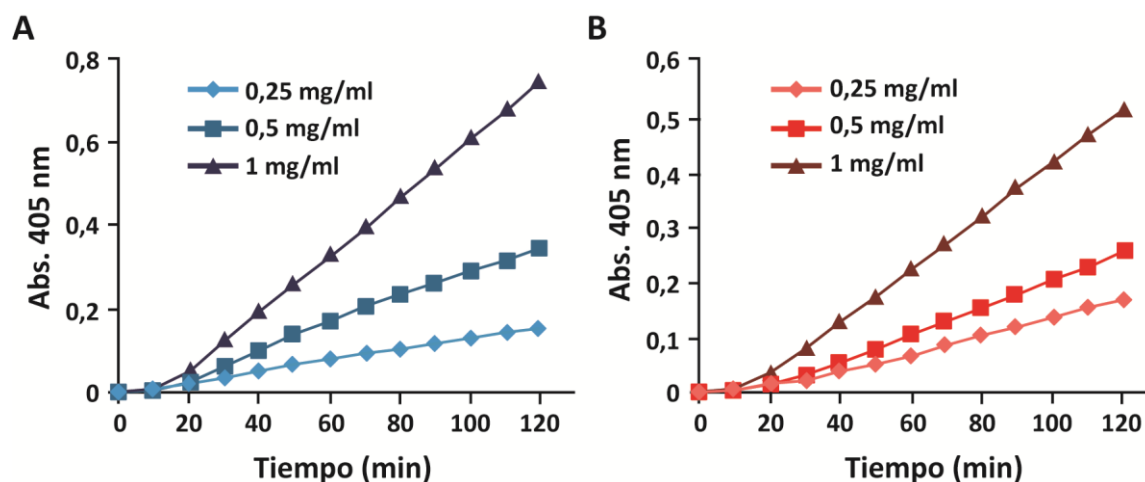


Figura 26. Actividad fosfodiesterasa de las proteínas TolR y PA2133 sobre bis-*p*-nitrofenilfosfato. La actividad fosfodiesterasa se midió como el aumento de la absorbancia a 405 nm. Las células *E. coli* DH10B (pIZtolR) (A) y *E. coli* DH10B (pIZ2133) (B) fueron cultivadas anaeróbicamente en medio LB que contiene nitrato potásico 10 mM e IPTG 1 mM, a 30°C durante 16 h. La obtención de los extractos celulares y el ensayo de la actividad fosfodiesterasa se realizaron como se detalla en el apartado 9.6 de Materiales y Métodos. Se muestran las curvas de actividad obtenidas utilizando 0,25, 0,5 y 1 mg/ml de proteína total del extracto que contiene el gen *tolR* (A) y del extracto que contiene la PDE PA2133 (B), tras sustraer la absorbancia debida a las posibles fosfodiesterasas que contiene el extracto de la cepa *E. coli* DH10B complementada con el plásmido control pIZ1016.

2.4. TolR se induce en presencia de tolueno *in vivo*.

Los experimentos de formación de biopelículas realizados en *E. coli* TRMG indicaron que TolR se comportaba como la PDE de di-GMPc control PA2133, aunque la actividad fosfodiesterasa era similar tanto en ausencia (Fig. 25) como en presencia (datos no mostrados) del inductor tolueno, sugiriendo una actividad PDE basal suficiente para disminuir los niveles celulares de di-GMPc y ocasionar una reducción en la formación de biopelículas en este sistema de estudio. Para comprobar si el efecto activador del tolueno sobre la actividad autoquinasa del supradominio sensor de TolR (Fig. 19) también producía un incremento de la actividad PDE de di-GMPc en el supradominio regulador de respuesta de TolR, se empleó un sistema reportero de los niveles de celulares de di-GMPc previamente caracterizado y puesto a punto en *P. aeruginosa* (Baraquet y cols., 2012). Así, la cepa *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta pel \Delta psl \Delta wspF$ *PpelA::lacZ* (*P. aeruginosa* PAO1pel) posee una disrupción en los genes *pel*, *psl* y *wspF*, principales genes regulados por los niveles de di-GMPc a través del regulador transcripcional FleQ, y una fusión transcripcional del promotor *pelA* dependiente del activador FleQ al gen

reportero *lacZ*, de forma que, dependiendo de los niveles celulares de di-GMPc éste se une a FleQ induciendo la transcripción del gen *lacZ* (Fig. 27) que será cuantificable midiendo la actividad β -galactosidasa resultante (Baraquet y cols., 2012).

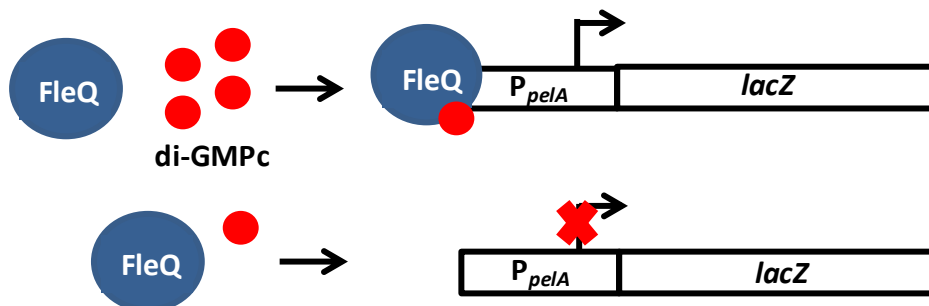


Fig. 27. Esquema del funcionamiento del sistema reportero de los niveles celulares de di-GMPc en *P. aeruginosa* PAO1pel. El sistema reportero se basa en la realización de ensayos β -galactosidasa con la cepa *P. aeruginosa* PAO1pel (Tabla 1), que contiene en monocopia la fusión transcripcional *PpelA::lacZ* de tal manera que en presencia de niveles elevados de di-GMPc generados por la inactivación de la principal PDE WspF en la cepa reportera, éste se une a FleQ, promoviendo así su unión al promotor y por tanto induciendo la transcripción del gen *lacZ* y la actividad β -galactosidasa. Por el contrario, cuando los niveles celulares de di-GMPc se reducen en la cepa reportera, e.g., presencia de una actividad PDE, disminuye la activación del regulador FleQ sobre el promotor *PpelA* y, por tanto, disminuye la transcripción del gen reportero *lacZ*.

Se transfirieron por electroporación los plásmidos pIZ1016, pIZtolR, pIZtolR^{H190V} y pIZ2133 a la cepa reportera *P. aeruginosa* PAO1pel, y se midió la actividad β -galactosidasa de las cepas resultantes cultivadas anaeróbicamente en ausencia o en presencia de tolueno. Se observó que, en ausencia de tolueno, la cepa *P. aeruginosa* PAO1pel (pIZtolR) complementada con el gen *tolR* presentó una ligera disminución en los niveles de actividad β -galactosidasa en comparación con los niveles observados en la cepa *P. aeruginosa* PAO1pel que contiene el plásmido control pIZ1016 (Fig. 28A). Sin embargo, la disminución en la actividad β -galactosidasa se hizo mucho más acusada cuando la cepa *P. aeruginosa* PAO1pel (pIZtolR) se cultivó en presencia de tolueno (Fig. 28A), observándose una disminución similar a la obtenida con la cepa *P. aeruginosa* PAO1pel complementada con el plásmido pIZ2133 que expresa la PDE de di-GMPc control PA2133 (Fig. 28A). Por tanto, estos resultados revelan que la proteína TolR tiene una actividad fosfodiesterasa de di-GMPc basal (en ausencia de tolueno) que representa un 15-20% de la actividad PDE máxima que se obtiene en presencia del

inductor tolueno. Cabe destacar que, al igual que se había observado en el ensayo de formación de biopelículas (Fig. 25), la actividad PDE de di-GMPc de TolR no se observó cuando las células *P. aeruginosa* PAO1pel (pIZTolR) se cultivaron aeróbicamente (Fig. 28B), o cuando la cepa *P. aeruginosa* PAO1pel se complementó con el gen mutante *tolR*^{H190V} que codifica una proteína sin actividad autoquinasa (Fig. 28A).

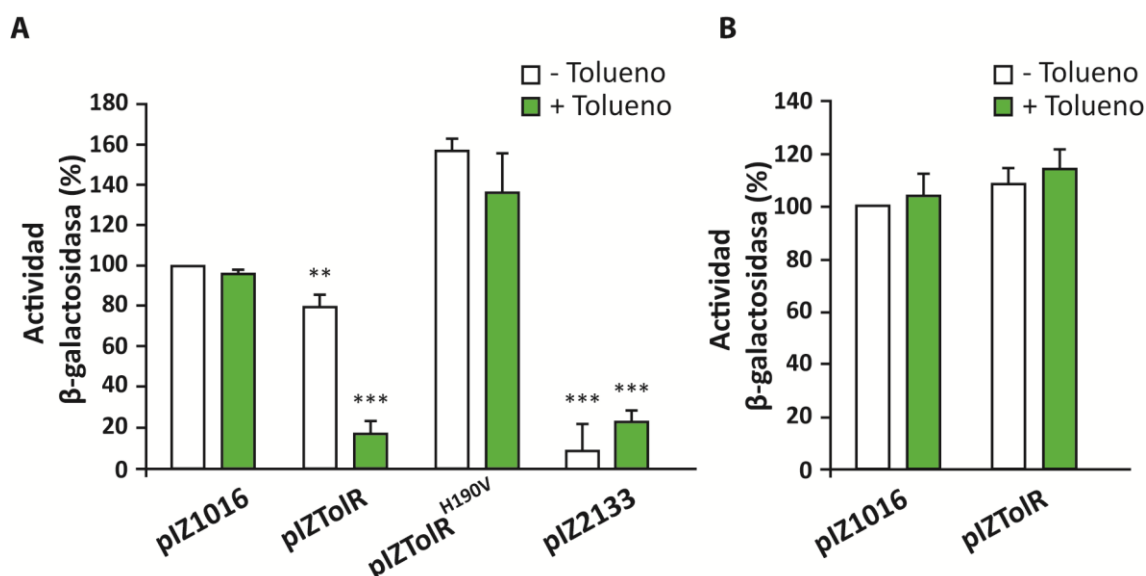


Figura 28. Expresión de la fusión transcripcional *PpelA::lacZ* en la cepa reportera *P.aeruginosa* PAO1pel conteniendo los genes *tolR*, *tolR*^{H190V} o *PA2133*. Medida de la actividad β-galactosidasa en la cepa *P. aeruginosa* PAO1pel complementada con los plásmidos pIZ1016 (control negativo), pIZTolR (codifica el gen *tolR* parental), pIZTolR^{H190V} (codifica el gen *tolR*^{H190V}) o pIZ2133 (codifica la fosfodiesterasa control PA2133 de *P.aeruginosa* PAO1), según se detalla en el apartado 9.1 de Materiales y Métodos. Las células fueron cultivadas anaeróbicamente (A) o aeróbicamente (B) en medio LB con IPTG 1 mM a 30°C durante 16 h en ausencia (barras blancas) o en presencia (barras verdes) de tolueno 100 μM. La actividad β-galactosidasa se expresa en % respecto a la actividad de la cepa control conteniendo el plásmido pIZ1016 y cultivada en ausencia de tolueno (160 Unidades Miller). Las barras muestran la desviación estándar de los resultados de tres experimentos independientes. Los asteriscos muestran la significancia usando el estadístico de análisis de varianza ANOVA y el test Student-Newman-Keuls: P<0,001 (***) y P<0,01 (**).

En conjunto estos resultados demuestran que la proteína TolR presenta una actividad fosfodiesterasa de di-GMPc en anaerobiosis que requiere un dominio autoquinasa funcional y cuyos niveles dependen de la presencia de tolueno, el inductor de la actividad autoquinasa, confirmando que se comporta como un sistema regulador HTCS.

2.5. TolR es un HTCS que responde *in vivo* a distintos compuestos efectores de manera dosis-dependiente.

Como se había demostrado anteriormente *in vitro* (Fig. 21), TolR reconoce una amplia variedad de compuestos aromáticos, así como algunos compuestos alifáticos tales como el hexano y ciclohexano, como inductores de la actividad autoquinasa. Para confirmar el efecto *in vivo* de alguno de estos efectores sobre la actividad PDE de di-GMPc de TolR se seleccionaron dos posibles inductores, el benceno y el hexano, y un no inductor, el benzoato, llevando tolueno como control positivo de inducción de la actividad PDE (Fig. 28). Empleando las cepas reporteras *P. aeruginosa* PAO1pel (pIZ1016) control y PAO1pel (pIZTolR), se comprobó la capacidad de estos compuestos para disminuir los niveles de di-GMPc medido como disminución de actividad β -galactosidasa de dichas cepas. Se observó que en el caso de la cepa complementada con el gen *tolR*, la presencia de benceno o hexano 500 μ M producía una disminución de la actividad β -galactosidasa similar a la obtenida en presencia de tolueno 100 μ M (Fig. 29), mientras que en el caso del benzoato sólo se observó la disminución basal que se obtiene en ausencia de inductor (Fig. 29). Estos resultados confirman los resultados obtenidos *in vitro* (Fig. 21), y sugieren que TolR se comporta *in vivo* como un HTCS cuyo regulador de respuesta (PDE de di-GMPc) responde a la presencia de determinados compuestos aromáticos (y alguno no aromático como el hexano) capaces de inducir la actividad histidina quinasa sensora.

Para determinar si había un efecto dosis-dependiente de la actividad PDE de di-GMPc con los inductores positivos, se ensayaron distintas concentraciones de algunos de estos compuestos. En el caso del tolueno, la cepa complementada con el gen *tolR* en presencia del hidrocarburo a una concentración de 10 μ M, mostró sólo una ligera reducción de la actividad β -galactosidasa, que se incrementó significativamente hasta la máxima reducción observada a una concentración de tolueno 100 μ M; concentraciones de tolueno superiores (1 mM) no incrementaron la bajada de la actividad β -galactosidasa de la cepa reportera observada con tolueno 100 μ M. En el caso del benceno, una concentración 100 μ M no generó disminución en la actividad β -galactosidasa, alcanzándose la máxima reducción a 500 μ M - 1 mM (Fig. 29). Por lo tanto, como ya se observó en el ensayo de actividad autoquinasa *in vitro* (Fig. 21), el

tolueno se comporta como uno de los inductores más eficaces de la actividad PDE de di-GMPc de TolR *in vivo*.

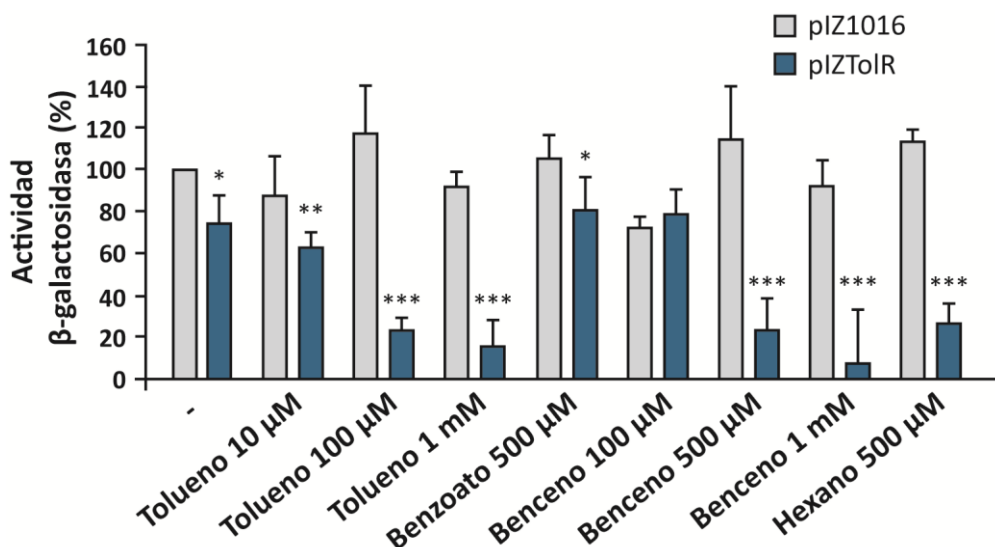


Figura 29. Efecto de diferentes compuestos sobre la expresión de la fusión transcripcional *PpelA::lacZ* en *P. aeruginosa* PAO1pel conteniendo el gen *tolR*. Medida de la actividad β-galactosidasa en la cepa *P. aeruginosa* PAO1pel complementada con los plásmidos pIZ1016 (control negativo; barras grises) o pIZTolR (codifica el gen *tolR*; barras azules) según se detalla en el apartado 9.1 Materiales y Métodos. Las células fueron cultivadas anaeróbicamente en medio LB con IPTG 1 mM a 30°C durante 16 h en ausencia (-) ó en presencia de las distintas concentraciones de inductores que se detallan. La actividad β-galactosidasa se expresa en % respecto a la actividad de la cepa control conteniendo el plásmido pIZ1016 y cultivada en ausencia de tolueno (160 Unidades Miller). Las barras muestran la desviación estándar de los resultados de tres experimentos independientes. Los asteriscos muestran la significancia usando el estadístico de análisis de varianza ANOVA y el test Student-Newman-Keuls: P<0,001 (***), P<0,01 (**) y P<0,05 (*).

2.6. El residuo Phe⁷⁹ del dominio sensor PAS está implicado en la interacción con las moléculas efectoras de TolR.

En apartados anteriores quedó demostrado el efecto activador del tolueno y otras moléculas efectoras sobre la actividad autoquinasa y, por ende, sobre la actividad PDE de di-GMPc de TolR. El análisis de la estructura primaria de TolR reveló la existencia de un dominio PAS localizado en el extremo N-terminal de TolR y presuntamente implicado en la detección de las moléculas efectoras (Fig. 5). Los modelos de *docking* del dominio PAS con la molécula de tolueno presentados anteriormente han revelado la región de interacción con el efector y los aminoácidos potencialmente implicados en la proteína TolR (Fig. 22). Un análisis detallado de la secuencia del dominio PAS de TolR

Resultados

reveló una alta identidad de secuencia con dominios sensores PAS de otras histidina quinazas que responden a la presencia de hidrocarburos aromáticos, no sólo TodS (47% identidad), sino otros como TmoS (51 % identidad) o TutC (54 % identidad) (Lau y cols., 1997; Yen y cols., 1991; Coschigano y cols., 1997) (Fig. 30). En la ampliamente caracterizada histidina quinasa híbrida TodS se ha identificado el residuo Phe⁷⁹ del dominio sensor PAS como responsable de la interacción con los hidrocarburos aromáticos (Busch y cols., 2007). El residuo de Phe correspondiente se encuentra conservado también en TmoS, TutC y TolR, lo que sugería su implicación directa en el reconocimiento de las moléculas efectoras en estas histidina quinazas. Además, el residuo Phe⁷⁹ está entre los aminoácidos predichos por *docking* implicados en la interacción de TolR con tolueno (Fig. 22). Por ello, se procedió a confirmar la implicación del Phe⁷⁹ de TolR residuo en la interacción con compuestos aromáticos.

| | |
|------|---|
| TolR | MSTFDRQLFSEASTVRVRDSVLNESDDDATFRQKLARIILDGMFEFVGLLDPEGRIVDIS |
| TodS | MSSSLDRKKPQNRSKNNYYNICLKEKGSEELTCEEHARIIFDGLYEFVGLLDAHGNVLEVN |
| TmoS | MSSSLDKRKTQNRSKNSYSICLKEKASAELKREELARIIFDGLYEFVGLLDAQGNVLEVN |
| TutC | MTSNSSVSDISAVLRVRDVTLRVDDLQTYREKLARVVDGLYEFVGLLDAKGNTLEIN |
| | * ** ** * |
| TolR | RRALDGAGVQLDDIRGKPFWEARWWAVSEELREV-AHDLVRRARTGEFVRCDELVYGAA |
| TodS | QVALEGGGITLEEIRGKPFWKARWWQISKKTEA-TQKRLVETASSGEFVRCDEILGKSG |
| TmoS | QAALNGAGVTLEEIRGKPFWKARWWQISKESVA-NQKRLVEAASSGEFVRCDEILGKSG |
| TutC | QAALDGAGTRLEDIRDKPFWEARWWQVSRETQEE-QRKLARASAGEFVRCDEIYGRAS |
| | ** * * * * * * * * * |
| TolR | GKERVVIDFSLQPVPRDEQGRVVFLPEGRNITEKKHAEIELAHKNAELQQLIDKVRQLDA |
| TodS | GREVIAVDFSLLPICNEEGSIVYLLAEGRNITDKKKAEMALALKNQELEQSVCEIRKLDN |
| TmoS | GREVIAVDFSLLPIDRDEQENIVFLAEGRNITDKKKAEMALALKNHELEQLVERIRKLDN |
| TutC | GEETIVVDYSILPIRDCNGKVVFLPEGRNITDKKLAEAEELARKNEELQHLLEKIRQLDE |
| | * * * * * * * * * * |

Figura 30. Comparación de la secuencia de aminoácidos del dominio PAS de TolR y otras Histidina quinazas que reconocen hidrocarburos aromáticos. Las secuencias de aminoácidos del dominio sensor PAS de las proteínas TolR de *Azoarcus* sp. CIB ([ABK15663.1](#)), TodS de *P. putida* DOT-T1E ([E0X9C7.1](#)), TmoS de *P. mendocina* ([Q8KIY1.1](#)) y TutC de *Thauera aromatica* ([AAD12184.1](#)) fueron alineadas usando el programa de alineamiento múltiple de secuencias ClustalW. Los residuos de aminoácidos de cada secuencia se indican con el código estándar de una sola letra. En amarillo se indica el residuo de Phe conservado responsable de la interacción de TodS con hidrocarburos aromáticos. Se señalan también en verde otros residuos del bolsillo de interacción con efectos predichos en TolR.

Para ello se procedió a generar la proteína TolR^{F79A} mutante, sustituyendo la Phe⁷⁹ del dominio PAS por una Ala mediante mutagénesis dirigida. Así, se construyó el plásmido pIZTolR^{F79A} que expresa el gen *tolR*^{F79A} bajo el control del promotor *Ptac* en el

plásmido promiscuo pIZ1016 (Fig. 31A). Se electroporó el plásmido pIZtoIR^{F79A} en la cepa *P. aeruginosa* PAO1pel generando la cepa PAO1pel (pIZtoIR^{F79A}) y se midió la actividad β -galactosidasa de dicha cepa en ausencia o presencia de algunos inductores, e.g., tolueno, benceno y hexano. Como se observa en la figura 31B tanto en ausencia como en presencia de los inductores la cepa complementada con el gen *tolR*^{F79A} mostró una ligera disminución de la actividad β -galactosidasa frente a la cepa portadora del plásmido vacío, disminución que se corresponde con la observada cuando la cepa reportera se complementa con el gen *tolR* nativo en ausencia de inductor (Fig. 28), y que es debida a la actividad basal previamente demostrada para la proteína TolR.

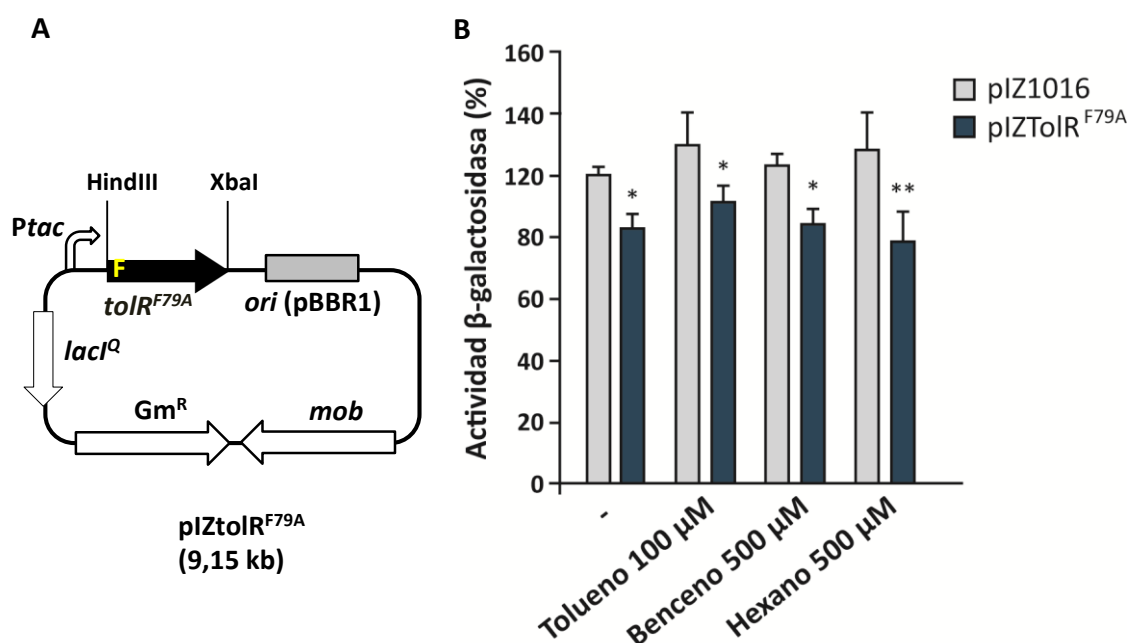


Figura 31. Efecto de la sustitución del residuo Phe⁷⁹ en la inducción de la actividad de TolR. A) Representación esquemática del plásmido pIZtoIR^{F79A}. El plásmido pIZtoIR^{F79A} se construyó como se indica en el apartado 3.6 de Materiales y Métodos. Se representa el origen de replicación (*ori*pBBR1), la región de movilización (*mob*) y el gen que codifica la resistencia a gentamicina (*Gm^R*) del plásmido pIZ1016 y sus derivados. Se representa con una flecha curvada blanca el promotor *Ptac*. *lacI*^Q, gen que codifica el represor LacI. Las dianas de restricción utilizadas para el clonaje del gen *tolR*^{F79A} se indican como: HindIII y XbaI. B) Expresión de la fusión transcripcional *PpelA::lacZ*. Medida de la actividad β -galactosidasa en la cepa *P. aeruginosa* PAO1pel complementada con los plásmidos pIZ1016 (control negativo; barras grises) o pIZtoIR^{F79A} (codifica el gen *tolR*^{F79A}; barras azules) según se detalla en el apartado 9.1 de Materiales y Métodos. Las células fueron cultivadas anaeróbicamente en medio LB con IPTG 1 mM a 30°C durante 16 h en ausencia (-) o en presencia de los distintos inductores. Las barras muestran la desviación estándar de los resultados de tres experimentos independientes. Los asteriscos muestran la significancia usando el estadístico de análisis de varianza ANOVA y el test Student-Newman-Keuls: P < 0,01 (**) y P < 0,05 (*).

Por lo tanto, estos resultados revelan que la proteína mutante TolR^{F79A} no es capaz de activarse en presencia de la molécula inductora y, por ende, que el residuo Phe⁷⁹ de TolR está implicado en la interacción del dominio sensor PAS con el efector.

2.7. Comparación del sistema HTCS TolR con el sistema regulador de dos componentes clásico (CTCS) artificial TolR_{SK-RR}.

Como ha quedado demostrado con los resultados expuestos más arriba, TolR es uno de los pocos ejemplos descritos hasta la fecha de sistema regulador HTCS. Dado que se conoce muy poco sobre los sistemas HTCS y sobre sus posibles ventajas/inconvenientes respecto a los sistemas CTCS, nos planteamos investigar si el hecho de que los dos componentes de un sistema regulador clásico se encuentren fusionados en una única molécula, como ocurre en TolR, supone alguna ventaja para algún proceso fisiológico concreto de la bacteria huésped. Para abordar este objetivo, se procedió inicialmente a diseñar a partir de la proteína nativa TolR un sistema regulador de dos componentes clásico artificial consistente en una proteína quinasa sensora (TolR_{SK}) y un regulador de respuesta efector (TolR_{RR}).

2.7.1. Clonaje e hiperexpresión del componente quinasa sensor (TolR_{SK}) y el componente regulador de respuesta (TolR_{RR}).

Para abordar este objetivo, se amplificó por PCR y se clonó el supradominio N-terminal de TolR conteniendo el dominio PAS sensor y el dominio autoquinasa AK en el vector de hiperexpresión pET29a, dando lugar al plásmido pETtolR_{SK} (Fig. 32A). La proteína TolR_{SK} se purificó parcialmente como se detalla en el apartado 8.2.2 de Materiales y Métodos. La masa molecular del monómero de TolR_{SK} (50 kDa), era coincidente con la masa molecular teórica (48051,8 Da) (Fig. 32C).

Asimismo, se amplificó por PCR y se clonó el supradominio C-terminal de tolR conteniendo el dominio REC, DGC degenerado y PDE en el vector de hiperexpresión pTYB12, dando lugar al plásmido pTYBtolR_{RR} (Fig. 32B), el cual codifica un gen *tolR_{RR}* recombinante que fusiona un gen de una inteína de *Saccharomyces cerevisiae* (55 KDa) en el extremo 5' y bajo el control del promotor *P_{T7}*. La proteína TolR_{RR} se purificó parcialmente como se detalla en el apartado 8.2.3 de Materiales y Métodos. La masa

molecular del monómero de TolR_{RR} (68 kDa), era coincidente con la masa molecular teórica (68481,6 Da) (Fig. 32D).

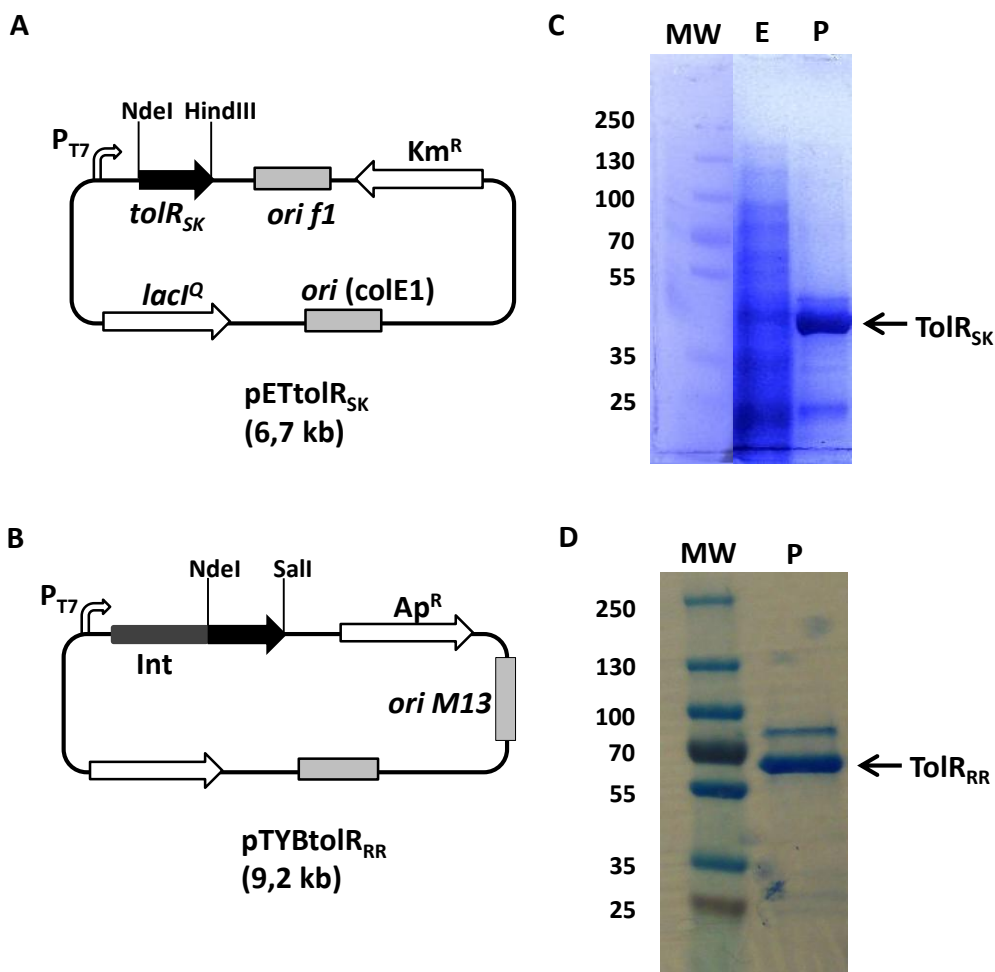


Figura 32. Representación de los plásmidos que expresan las proteínas artificiales TolR_{SK} y TolR_{RR} y purificación parcial de las mismas. A y B) Representación esquemática de los plásmidos pETtolR_{SK} y pTYBtolR_{RR}. Los plásmidos se construyeron siguiendo el protocolo que se detalla en el apartado 3.7 de Materiales y Métodos. En el plásmido pETtolR_{SK}, se representa el promotor P_{T7} , el gen que confiere resistencia a la kanamicina (Km^R), los orígenes de replicación (*ori f1*, origen de replicación del bacteriófago f1; y *ori(ColE1)* origen de replicación ColE1) y el gen que codifica el represor LacI (*lacI^Q*). El extremo 3' del gen *tolR* recombinante con el *tag* de His se señala como His₆. En el plásmido pTYBtolR_{RR}, se representa el promotor P_{T7} , el gen que codifica la fusión Int-*tolR_{RR}*, el gen que confiere resistencia a la ampicilina (Ap^R), el origen de replicación *ori M13* (origen de replicación del bacteriófago M13) y *ori (ColE1)* (origen de replicación del vector pBR322) y el gen que codifica el represor LacI (*lacI^Q*). En el plásmido pETtolR_{SK} las dianas de restricción utilizadas para el clonaje se indican como NdeI y HindIII; en el plásmido pTYBtolR_{RR} las dianas de restricción utilizadas para el clonaje se indican como NdeI y SalI. **C y D) Proteína TolR_{SK} y TolR_{RR} parcialmente purificadas.** Geles SDS-PAGE (12,5 %) en los que se analizó la proteína purificada mediante el método descrito en la sección 8.2.2 (TolR_{SK}) y 8.2.3 (TolR_{RR}) de Materiales y métodos. Calle MW, marcadores de masa molecular cuyos tamaños (en kDa) se detallan a la izquierda de la imagen. Calle P, proteínas TolR_{SK}-His₆ (48 kDa) y TolR_{RR} (68,5 kDa) parcialmente purificadas, cuya posición en el gel se señala con una flecha.

2.7.2. TolR_{SK} cataliza su autofosforilación y se activa por tolueno.

Con el fin de demostrar *in vitro* si la proteína TolR_{SK} presentaba capacidad para autofosforilarse se realizó un ensayo de fosforilación estándar en presencia o en ausencia de tolueno a lo largo del tiempo. Como se muestra en la figura 33, el porcentaje de fosforilación de TolR_{SK} aumentó con el tiempo del ensayo, alcanzando el máximo nivel a los 30 min de reacción. La fosforilación obtenida es significativamente mayor en presencia de tolueno. Sin embargo, y a diferencia de lo observado con la proteína nativa TolR, la fosforilación no decae significativamente incluso después de 60 min de reacción, y la activación por tolueno es de unas 2,5 veces en vez de las 5 veces observadas con la proteína nativa (Fig. 19). Además, la comparación de la intensidad de las bandas de fosforilación relativa a la cantidad total de proteína utilizada en el ensayo (Figs. 19 y 33) sugiere que TolR_{SK} se autofosforila más eficazmente que TolR nativa, especialmente en ausencia de tolueno.

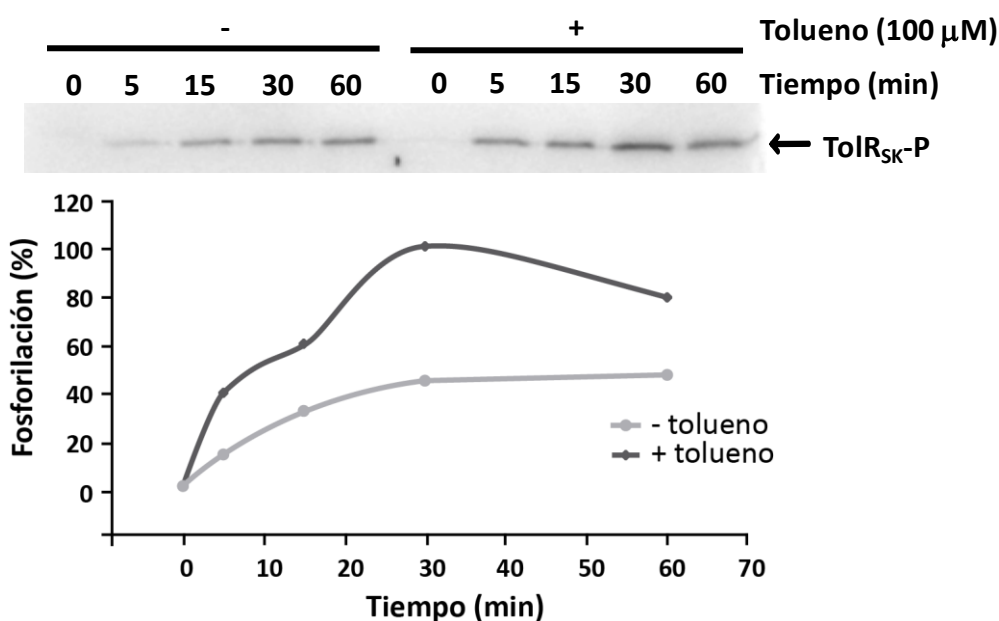


Figura 33. Ensayo de autofosforilación de la proteína TolR_{SK}. La proteína TolR_{SK}-His₆ (0,1 μM) fue incubada en presencia de γ-³²P-ATP en las condiciones de fosforilación *in vitro* que se indican en el apartado 9.2 de Materiales y Métodos. Se tomaron muestras a los 0, 5, 15, 30 y 60 min de incubación y éstas fueron analizadas mediante SDS-PAGE 12,5 %. La banda correspondiente a la proteína fosforilada (TolR_{SK}-P) se indica con una flecha. En la parte inferior de la figura se representa la intensidad de las bandas de fosforilación (densitometrado), considerando 100 % la intensidad a los 30 min de reacción en presencia de tolueno.

Estos resultados demuestran que la proteína artificial TolR_{SK} constituida por los dominios sensor PAS y autoquinasa AK, es una proteína funcional que no pierde la capacidad de autofosforilarse *in vitro* en presencia de ATP ni la capacidad para detectar y activarse en presencia de hidrocarburos aromáticos.

2.7.3. TolR_{SK} fosforila en *trans* al regulador de respuesta TolR_{RR}.

Una vez confirmado que TolR_{SK} era capaz de autofosforilarse el siguiente aspecto a comprobar fue si TolR_{SK}-P era capaz de transferir el fosfato a TolR_{RR} mediante ensayos de fosforilación *in vitro* entre ambas proteínas. Las proteínas TolR_{SK} y TolR_{RR} se incubaron en presencia de γ -³²P-ATP, de tolueno a una concentración de 100 μ M y en una relación molar 1:1, equiparando a lo que ocurre en un sistema HTCS, y se monitorizó la transferencia de fosfato radiactivo a diferentes tiempos de incubación (Fig. 34).

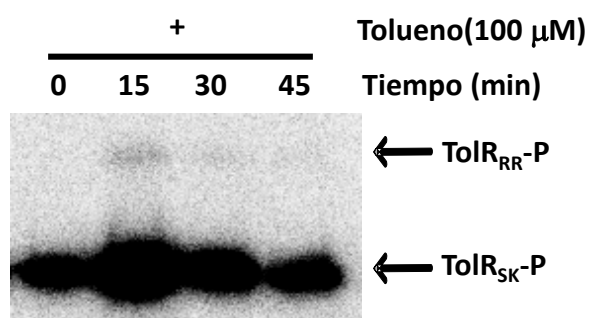


Figura 34. Monitorización de la transferencia de fosfato entre las proteínas TolR_{SK} y TolR_{RR}. Las proteínas TolR_{SK} (2,5 μ M) y TolR_{RR} (2,5 μ M) se incubaron en presencia de γ -³²P-ATP y 100 μ M de tolueno, en las condiciones de fosforilación *in vitro* que se indican en el apartado 9.4 de Materiales y Métodos. Las reacciones se detuvieron a los tiempos indicados en la figura y se analizaron mediante SDS-PAGE 10 %. Con flechas se han señalado las bandas correspondientes a cada proteína fosforilada, TolR_{SK} (TolR_{SK}-P) o TolR_{RR} (TolR_{RR}-P).

Del análisis de los resultados presentados en la figura 34 se pueden deducir varias conclusiones. Por un lado, ya a tiempos cortos se comprueba una eficaz autofosforilación de la proteína TolR_{SK}, cuya señal va disminuyendo con el tiempo, a diferencia de lo observado con la proteína TolR_{SK} sola (Fig. 33), en paralelo a la aparición de proteína TolR_{RR} fosforilada, demostrando que las proteínas TolR_{SK} y TolR_{RR} participan en una cascada de fosforilación típica de un sistema regulador CTCS. Por otro lado, la cantidad de proteína TolR_{RR} fosforilada que se observa es pequeña y no da

Resultados

cuenta de toda la pérdida de marcaje radiactivo del componente quinasa, sugiriendo que la actividad fosfatasa de TolR_{SK} sobre TolR_{RR}-P es significativamente más eficiente que su actividad de transferencia de fosfato al dominio *receiver* de TolR_{RR}.

Para comprobar si el tolueno facilita la transferencia de fosfato desde TolR_{SK} a TolR_{RR}, se repitió el experimento anterior en ausencia de tolueno. Como se muestra en la figura 35, y en comparación con la figura 34, en ambos casos se observó la aparición de una tenue banda de proteína TolR_{RR} fosforilada que se mantiene hasta los 30 min de reacción, por lo que no parece que el tolueno tenga ningún efecto activador significativo sobre la reacción de transferencia de fosfato, al igual que se dedujo de los estudios con la proteína nativa TolR (Fig. 23).

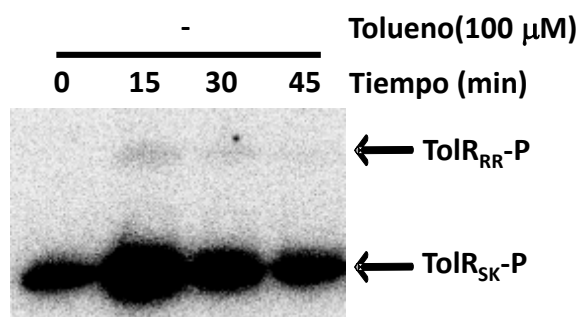


Figura 35. Monitorización de la transferencia de fosfato entre las proteínas TolR_{SK} y TolR_{RR} en presencia o ausencia de tolueno. Las proteínas TolR_{SK} (2,5 μM) y TolR_{RR} (2,5 μM) se incubaron en presencia de γ-³²P-ATP en las condiciones de fosforilación *in vitro* que se indican en el apartado 9.4 de Materiales y Métodos. Las reacciones se detuvieron a los tiempos indicados en la figura y se analizaron mediante SDS-PAGE 10 %. Con flechas se han señalado las bandas correspondientes a cada proteína fosforilada, TolR_{SK} (TolR_{SK}-P) o TolR_{RR} (TolR_{RR}-P).

En conjunto, estos resultados demuestran que TolR_{SK} y TolR_{RR} son capaces de reproducir *in vitro* la cascada de fosforilación típica de los sistemas CTCS y que, por ello, constituyen un CTCS artificial (TolR_{SK-RR}) que podría ser utilizado para comparar su eficacia con la del sistema HTCS nativo TolR.

2.7.4. La transferencia de fosfato es más eficiente en TolR que en el sistema CTCS TolR_{SK}-TolR_{RR}.

Los experimentos realizados sobre la transferencia de fosfato, representados en las figs. 23 y 35, sugieren que tanto la proteína TolR, y especialmente el sistema CTCS artificial TolR_{SK-RR}, se autofosforilan en el dominio quinasa con elevada eficacia, pero una vez transferido el fosfato al dominio *receiver* éste es rápidamente eliminado como consecuencia de una elevada actividad fosfatasa que libera Pi, lo que se traducirá finalmente en un consumo importante de ATP. Por ello, cuanto más eficiente sea la transferencia del fosfato del dominio AK al dominio REC, más rápido se consumirá el ATP en una reacción de fosforilación *in vitro*. En este sentido, la medida del consumo de γ -³²P-ATP (Stephenson y Hoch, 2001) permitirá comparar la eficacia de la cascada de fosforilación del sistema nativo TolR con la del sistema CTCS TolR_{SK}-TolR_{RR}.

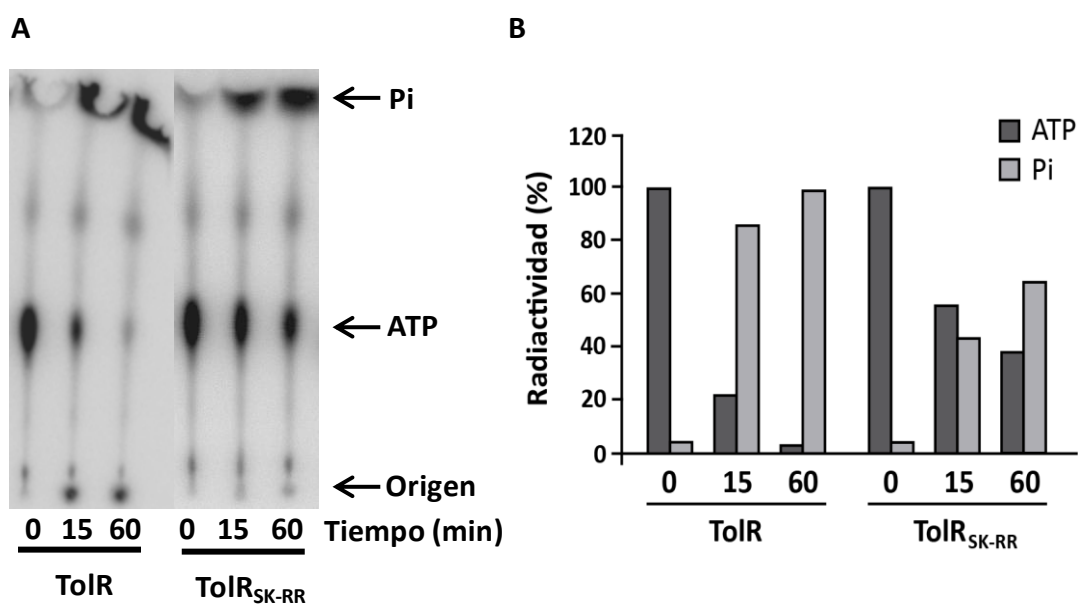


Figura 36. Estudio del consumo de ATP en ensayos de fosforilación con TolR y con el sistema TolR_{SK}-TolR_{RR}. A) Monitorización del fosfato marcado radiactivamente mediante cromatografía en capa fina. La proteína TolR (1 μ M) y la mezcla de las proteínas TolR_{SK} (1 μ M) y TolR_{RR} (1 μ M) se incubaron en presencia de γ -³²P-ATP y de tolueno 100 μ M en las condiciones de fosforilación *in vitro* que se indican en el apartado 9.2 de Materiales y Métodos. Las reacciones se detuvieron a los tiempos indicados en la figura y se analizaron mediante cromatografía en capa fina en placas de polietilenimina (PEI)-celulosa como se detalla en el apartado 9.5 de Materiales y Métodos. Con una flecha se ha señalado el punto de aplicación (origen), la banda correspondiente al ATP (ATP) y la banda correspondiente al fosfato inorgánico liberado (Pi). B) Cuantificación de la señal radiactiva. Se representa la intensidad de las bandas con señal radiactiva medida por densitometrado, considerando 100 +% la intensidad a los 0 min de reacción de cada condición. Se muestra el resultado de un experimento, que fue reproducible en tres experimentos independientes.

Para ello se incubó la proteína TolR o la mezcla de las proteínas TolR_{SK}-TolR_{RR} en relación 1:1, en presencia de γ -³²P-ATP y tolueno y se monitorizó la presencia de fosfato radiactivo (ATP y/o Pi) a diferentes tiempos de incubación mediante análisis en cromatografía en capa fina. En la figura 36 se observa que la proteína TolR consume casi el 80% del γ -³²P-ATP en los primeros 15 min de reacción, y el consumo es completo a los 60 min. Por el contrario el sistema TolR_{SK}-TolR_{RR} consume sólo un 40% de γ -³²P-ATP a los 15 min de reacción, manteniendo todavía un 35% de ATP sin consumir a los 60 min. Como cabría esperar de la eficiente actividad fosfatasa, la desaparición de la señal radiactiva del ATP va acompañada de la correspondiente aparición de la señal radiactiva del fosfato inorgánico (Pi) liberado (Fig. 36).

Este resultado sugiere que la cascada de fosforilación en el sistema CTCS TolR_{SK}-TolR_{RR} es menos eficiente que en el sistema nativo HTCS TolR. Dado que la eficiencia de autofosforilación de TolR_{SK} parece ser incluso superior a la de TolR (Fig. 33), los resultados presentados sugieren que la transferencia intramolecular del fosfato del dominio autoquinasa al dominio *receiver* en TolR es más eficiente que la transferencia intermolecular del fosfato del componente quinasa sensor TolR_{SK} al dominio *receiver* del componente regulador de respuesta TolR_{RR}. Esta conclusión permite especular con que el sistema nativo HTCS TolR genera en la célula una respuesta más eficaz que la que podría generar un sistema CTCS equivalente a TolR_{SK}-TolR_{RR}. Para profundizar en el estudio comparativo de los sistemas TolR y TolR_{SK}-TolR_{RR}, se procedió a valorar y comparar su actividad PDE de di-GMPc *in vivo*.

2.7.5. El sistema CTCS TolR_{SK}-TolR_{RR} es funcional *in vivo*.

Para determinar si el sistema CTCS TolR_{SK}-TolR_{RR} es funcional *in vivo* modulando los niveles de di-GMPc en la célula, se construyeron los plásmidos pIZtolR_{SK-RR}, que expresa los genes *tolR_{SK}* y *tolR_{RR}* separados en el plásmido promiscuo pIZ1016 (Fig. 37A), y pIZtolR_{RR}, que expresa sólo el gen *tolR_{RR}* en pIZ1016 (Fig. 37B). En ambos plásmidos, la expresión de los genes clonados está bajo el control del mismo sistema regulador *lacI^Q/Ptac* al igual que ocurre con el gen nativo *tolR* expresado en el plásmido pIZtolR (Tabla 2).

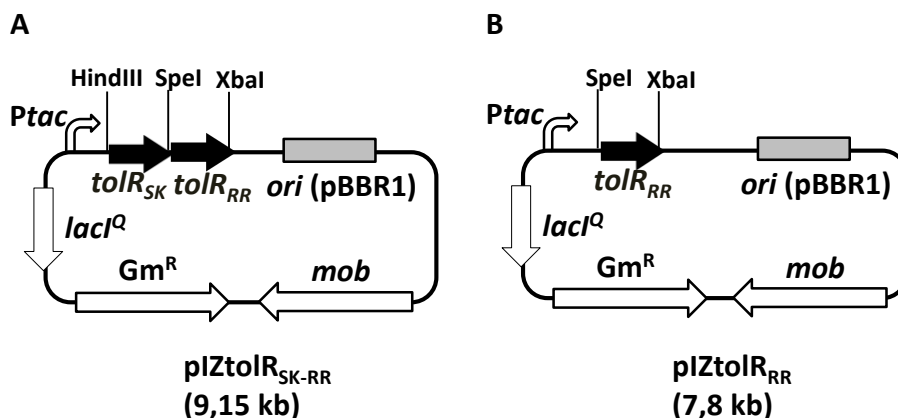


Figura 37. Representación esquemática de los plásmidos pIZtolR_{SK-RR} (A) y pIZtolR_{RR} (B). Los plásmidos se construyeron siguiendo el protocolo que se detalla en el apartado 3.8 de Materiales y Métodos. Se representa el origen de replicación (*ori*pBBR1), la región de movilización (*mob*) y el gen que codifica la resistencia a gentamicina (*Gm^R*) del plásmido pIZ1016 y sus derivados. Se representa con una flecha curvada blanca el promotor *Ptac*. *lacI^Q*, gen que codifica el represor LacI. Las dianas de restricción utilizadas para el clonaje de los genes *tolR_{SK-RR}* y *tolR_{RR}* se indican como HindIII, SpeI y XbaI. Las dianas de restricción utilizadas para el clonaje del gen *tolR_{RR}* se indican como SpeI y XbaI.

Se electroporaron los plásmidos pIZtolR_{SK-RR} y pIZtolR_{RR} en la cepa *P. aeruginosa* PAO1pel, y se midió la actividad β -galactosidasa en ausencia o en presencia de tolueno como inductor del sistema, en comparación con la de la cepa *P. aeruginosa* PAO1pel(pIZtolR). Se observó que al igual que en el caso de la cepa complementada con el gen nativo *tolR* (pIZtolR) (Fig. 28), la cepa complementada con el sistema CTCS artificial (pIZtolR_{SK-RR}), presenta una significativa disminución en los niveles de actividad β -galactosidasa en presencia del inductor tolueno (Fig. 38A). No obstante, la reducción de un 40 % de la actividad β -galactosidasa observada sin inductor en la cepa complementada con pIZtolR_{SK-RR}, refleja que la actividad basal PDE es mayor en esta cepa que en la cepa complementada con el gen *tolR* parental que sólo presenta una reducción del 25 % de la actividad β -galactosidasa. Por el contrario, la cepa complementada sólo con el regulador de respuesta codificado por el gen *tolR_{RR}* muestra una reducción no tan significativa de la actividad β -galactosidasa en presencia del inductor tolueno (Fig. 38A), confirmando que el componente quinasa sensor TolR_{SK} es necesario para que el sistema regulador funcione correctamente *in vivo*. Los resultados mostrados revelan, por lo tanto, que los dos componentes del sistema CTCS artificial TolR_{SK}-TolR_{RR} son capaces de interactuar *in vivo* de forma correcta,

reduciendo los niveles de di-GMPc en *P. aeruginosa* en presencia de la molécula inductora tolueno de forma similar a como lo hace el sistema nativo TolR.

Para demostrar si el sistema CTCS TolR_{SK}-TolR_{RR} también es funcional en el sistema homólogo, *Azoarcus* sp. CIB, se electroporaron los plásmidos pIZtolR_{SK-RR} (Fig. 37A) y pIZtolR_{RR} (Fig. 37B) en la cepa mutante *Azoarcus* CIBdtolR que contiene el gen *tolR* inactivado, y se realizaron ensayos de exposición súbita a una elevada concentración de tolueno para analizar posteriormente la viabilidad celular.

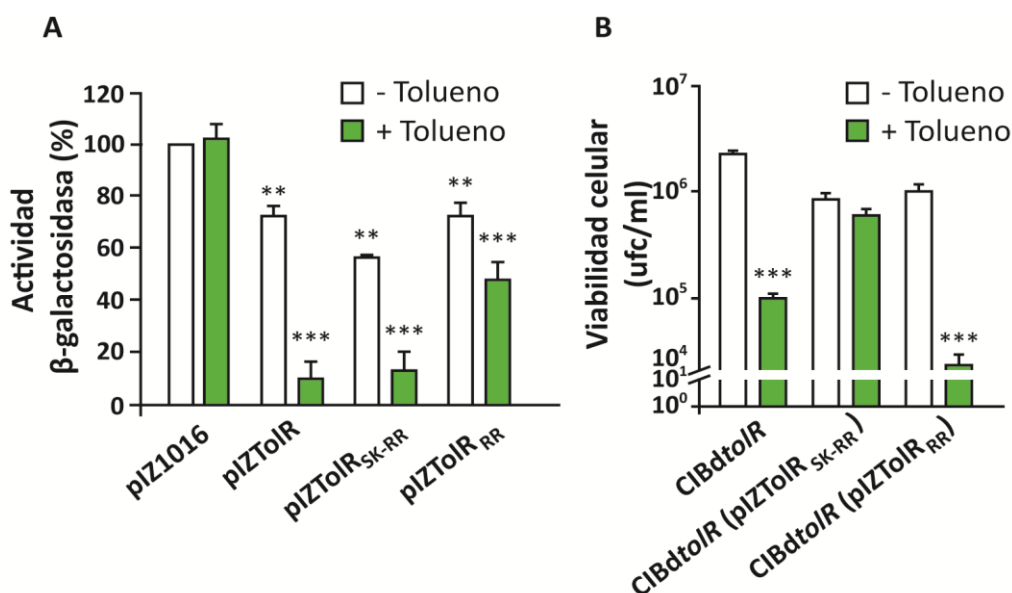


Figura 38. Análisis del CTCS TolR_{SK-RR} in vivo. A) Expresión de la fusión transcripcional *PpeIA::lacZ*. Medida de la actividad β-galactosidasa en la cepa *P. aeruginosa* PAO1pel complementada con los plásmidos pIZ1016 (control negativo), pIZtolR (codifica el gen *tolR* parental), pIZtolR_{SK-RR} (codifica los genes *tolR_{SK}* y *tolR_{RR}*) y pIZtolR_{RR} (codifica el gen *tolR_{RR}*) según se detalla en el apartado 9.1 de Materiales y Métodos. Las células fueron cultivadas anaeróbicamente en medio LB con IPTG 1 mM a 30°C durante 16 h en ausencia (barras blancas) o en presencia (barras verdes) de tolueno 100 μM. La actividad β-galactosidasa se expresa en % respecto a la actividad de la cepa control conteniendo el plásmido pIZ1016 y cultivada en ausencia de tolueno (160 Unidades Miller). **B) Ensayo de viabilidad de las cepas *Azoarcus* sp. CIB, *Azoarcus* sp CIBdtolR(pIZtolR_{SK-RR}) y *Azoarcus* sp CIBdtolR(pIZtolR_{RR}) tras choque de tolueno.** Cuantificación de las unidades formadoras de colonias (ufc/ml) en las cepas CIBdtolR, CIBdtolR(pIZtolR_{SK-RR}) y CIBdtolR(pIZtolR_{RR}). Las células fueron cultivadas anaeróbicamente en medio MC usando piruvato 0,2 % como fuente de carbono y se siguió el protocolo de exposición súbita a tolueno 20 mM que se describe en el apartado 5 de Materiales y Métodos. La viabilidad celular se mide plaqueando diluciones en placas de MC conteniendo succinato. Las barras muestran la desviación estándar de los resultados de tres experimentos independientes. Los asteriscos muestran la significancia usando el estadístico de análisis de varianza ANOVA y el test Student-Newman-Keuls: P<0,01 (**) y P<0,001 (***).

Como se observa en la figura 38B, la complementación de la cepa mutante *Azoarcus* CIBdtolR con el plásmido pIZtolR_{SK-RR} revierte la pérdida de viabilidad por el efecto tóxico del tolueno, al igual que se había observado anteriormente con la cepa complementada con el gen *tolR* nativo expresado en el plásmido pIZtolR (Fig. 17). Por el contrario, la complementación de la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIBdtolR con el plásmido pIZtolR_{RR} no es capaz de revertir la pérdida de viabilidad tras el choque de tolueno (Fig. 38B).

En resumen, estos resultados sugieren que el sistema artificial CTCS TolR_{SK}-TolR_{RR} es también funcional en *Azoarcus* sp. CIB, requiere de la interacción entre el componente sensor quinasa y el componente regulador de respuesta, y responde a la presencia de tolueno induciendo una respuesta adaptativa similar a la mediada por el sistema nativo TolR. Por otro lado, los resultados obtenidos con el componente regulador de respuesta TolR_{RR} revelan que la actividad PDE de di-GMPc basal (en ausencia del inductor tolueno) no es suficiente para revertir la pérdida de viabilidad ocasionada por el choque de tolueno, justificando la existencia de un mecanismo de activación molecular dependiente de tolueno en la proteína TolR.

2.7.6. El sistema HTCS TolR es más eficiente que el sistema CTCS TolR_{SK}-TolR_{RR} *in vivo*.

Para intentar comparar *in vivo* la eficacia del sistema nativo TolR con la del sistema artificial TolR_{SK}-TolR_{RR} se diseñó un ensayo de actividad PDE de di-GMPc a tiempos cortos. Para ello, se cuantificó la actividad PDE monitorizando la disminución en los niveles de transcrito del gen *cdrA* de *P. aeruginosa* PAO1, gen que codifica una adhesina de la matriz extrapolisacáridica que se genera en la formación de biopelículas y cuya expresión está regulada positivamente por los niveles de di-GMPc en la célula (Borlee y cols., 2010). Con este fin, se electroporó *P. aeruginosa* PAO1Δ*wspF*, una cepa que posee una disrupción en el gen *wspF*, que codifica la principal fosfodiesterasa de di-GMPc de *P. aeruginosa* PAO1, con los plásmidos pIZtolR y pIZtolR_{SK-RR}. Se extrajo el RNA de células de *P. aeruginosa* PAO1 Δ*wspF* (pIZtolR) y *P. aeruginosa* PAO1 Δ*wspF* (pIZtolR_{SK-RR}) cultivadas anaeróbicamente en ausencia o presencia de tolueno durante 1-2 h. En la figura 39 se muestra que sólo se aprecia una disminución significativa de

los niveles de transcrito de *cdrA* en presencia del gen *tolR* tras 2h de tratamiento con tolueno. En estas mismas condiciones, la presencia de los genes *tolR_{SK}-tolR_{RR}* en las células no cambia los niveles de transcrito *cdrA*.

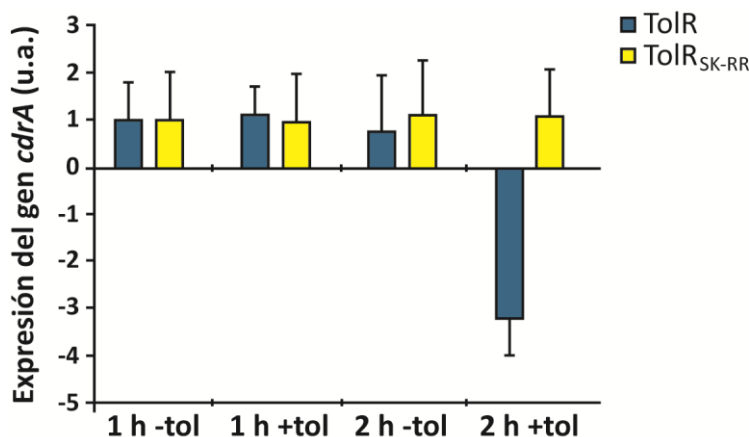


Figura 39. Monitorización de la expresión del gen *cdrA* en cepas de *P. aeruginosa* PAO1 que contienen el gen *tolR*, o el sistema artificial *tolR_{SK}-tolR_{RR}*. Medida de los niveles de transcrito *cdrA* mediante RT-PCR cuantitativa en la cepa PAO1 $\Delta wspF$ complementada con los plásmidos pIZtolR (TolR; barras azules) o pIZtolR_{SK-RR} (TolR_{SK-RR}; barras amarillas) según se detalla en el apartado 3.5 de Materiales y Métodos. Las células fueron cultivadas anaeróbicamente en medio LB con IPTG 1 mM a 30°C durante 1 ó 2 h en ausencia (-tol) o en presencia (+tol) de tolueno 100 μ M. Las barras muestran la desviación estándar de los resultados de tres experimentos independientes.

Por lo tanto, estos resultados sugieren que el sistema nativo TolR responde a la molécula efectora tolueno induciendo la actividad PDE de di-GMPc con mayor eficacia que el sistema CTCS TolR_{SK}-TolR_{RR}.

3. Identificación de genes implicados en la cascada de señalización controlada por el gen *tolR*.

Los resultados presentados en los Objetivos 1 y 2 de esta tesis demuestran que el gen *tolR* está implicado en la adaptación de *Azoarcus* sp. CIB a los hidrocarburos aromáticos, y que la actividad de este HTCS implica al segundo mensajero di-GMPc, respectivamente. Ambos resultados combinados sugieren la implicación del di-GMPc en la adaptación anaeróbica a los hidrocarburos aromáticos, una observación que no se había descrito hasta la fecha. Por este motivo, se procedió inicialmente a confirmar experimentalmente la implicación del di-GMPc en la resistencia de *Azoarcus* sp. CIB a tolueno.

3.1. La hidrólisis de di-GMPc restaura la resistencia a tolueno en la cepa *Azoarcus* sp. CIBdtolR.

Como se había observado anteriormente, la cepa *Azoarcus* sp. CIBdtolR posee menor resistencia a una concentración elevada de tolueno que la cepa parental CIB (Fig. 17), lo que sugiere que el posible incremento en los niveles de di-GMPc consecuencia de la inactivación del gen *tolR*, sería la causa de dicho fenotipo. Por otro lado, la complementación de la cepa *Azoarcus* sp. CIBdtolR con el gen *tolR* clonado en el plásmido pIZtolR restauraba la resistencia de la cepa recombinante al tolueno en anaerobiosis (Fig. 17), lo que sugería que la hidrólisis de di-GMPc por la actividad PDE de TolR era la responsable del incremento en la resistencia al tóxico y, por ende, que los niveles de di-GMPc en la célula están implicados en un nuevo mecanismo de adaptación anaeróbica a los hidrocarburos aromáticos. Para confirmar este punto, se analizó si la expresión de una PDE de di-GMPc heteróloga y no relacionada con TolR podría revertir también el fenotipo de sensibilidad a un choque de tolueno en la cepa *Azoarcus* sp. CIBdtolR.

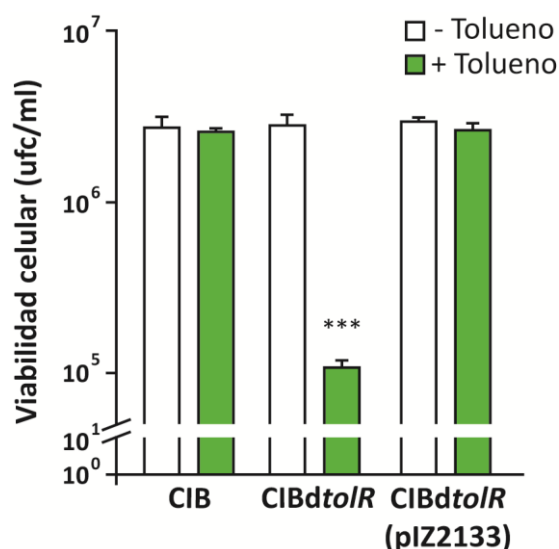


Figura 40. Ensayo de viabilidad celular tras exposición a una alta concentración de tolueno. Cuantificación de las unidades formadoras de colonias (ufc/ml) en las cepas *Azoarcus* sp. CIB (CIB), *Azoarcus* sp. CIBdtolR (CIBdtolR) y *Azoarcus* sp. CIBdtolR (pIZ2133) (CIBdtolR(pIZ2133)). Las células fueron cultivadas anaeróbicamente en medio MC usando piruvato 0,2 % como fuente de carbono, nitrato 10 mM como aceptor final de electrones e IPTG 200 μ M, durante 16 h a 30°C. Cuando las células alcanzan la fase exponencial media de crecimiento, se sometieron a un choque de tolueno 20 mM (barras verdes) o no (barras blancas) como se describe en el apartado 5 de Materiales y Métodos. La viabilidad celular se mide plaqueando diluciones en placas de MC con succinato. Las barras muestran la desviación estándar de los resultados de tres experimentos independientes. Los asteriscos muestran la significancia usando el estadístico de análisis de varianza ANOVA y el test Student-Newman-Keuls: $P < 0,001$ (***)

Para ello, se transfirió por electroporación el plásmido pIZ2133, que expresa la PDE de di-GMPc PA2133 de *P. aeruginosa*, a la cepa mutante CIB*dtolR* y se realizaron ensayos de viabilidad celular tras exponer las células a una alta concentración de tolueno. Como se muestra en la figura 40, la complementación con el plásmido pIZ2133 revierte totalmente el efecto de la inactivación del gen *tolR*, lo que indica que la hidrólisis de di-GMPc está asociada a una mayor resistencia al tolueno.

Por lo tanto, estos resultados sugieren que los niveles de di-GMPc regulan la resistencia al efecto tóxico de los hidrocarburos aromáticos en *Azoarcus* sp. CIB.

3.2. El gen *tolR* también está implicado en aspectos de la fisiología de *Azoarcus* sp. CIB que no dependen de la presencia de hidrocarburos aromáticos.

Como se ha mostrado en el apartado 2 de Resultados, la proteína TolR muestra una actividad autoquinasa y PDE de di-GMPc basal independiente de la presencia de hidrocarburos aromáticos (Figs. 23 y 28), lo que permitía sospechar que incluso en ausencia de tolueno la actividad PDE de di-GMPc basal podría estar implicada en el control de ciertos procesos celulares dependientes de los niveles de este segundo mensajero, e.g., agregación celular, formación de biopelículas, etc. (Römling y cols., 2013). Para explorar la posibilidad de que el gen *tolR* estuviese controlando en *Azoarcus* sp. CIB otros procesos no relacionados directamente con el metabolismo anaeróbico de los hidrocarburos aromáticos, se comparó el comportamiento de la cepa parental *Azoarcus* sp. CIB con el de la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB*dtolR* y con el de dicha cepa mutante complementada con el plásmido pIZ*tolR*, utilizando piruvato como fuente de carbono no aromática.

3.2.1. El gen *tolR* está implicado en la adaptación de *Azoarcus* sp. CIB al crecimiento anaeróbico en piruvato.

En primer lugar, se procedió a estudiar la cinética de crecimiento anaeróbico de *Azoarcus* sp. CIB, *Azoarcus* sp. CIB*dtolR* y *Azoarcus* sp. CIB*dtolR*(pIZ*tolR*) en piruvato, una buena fuente de carbono para la bacteria y que no tiene carácter aromático. Para ello, las tres cepas a estudio procedentes de un crecimiento anaeróbico en benzoato fueron cultivadas anaeróbicamente en medio mínimo MC con piruvato como fuente de carbono y energía. En la figura 41 puede observarse que para las tres cepas el

crecimiento máximo alcanzado en la fase estacionaria es similar, pero la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB*dtoI*R muestra una fase de latencia un poco mayor y una tasa de crecimiento ($\mu=0,19$) inferior a la mostrada por la cepa parental *Azoarcus* sp. CIB y el mutante complementado *Azoarcus* sp. CIB*dtoI*R(pIZ*Tol*R) ($\mu=0,37-0,4$).

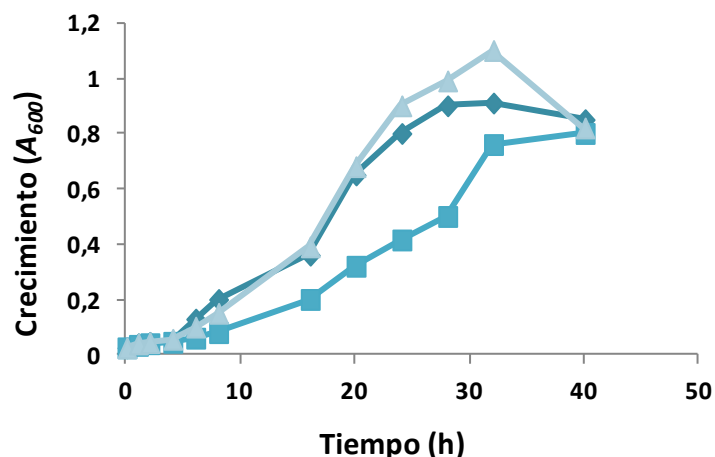


Figura 41. Curvas de crecimiento anaeróbico de *Azoarcus* sp. CIB, *Azoarcus* sp. CIB*dtoI*R y *Azoarcus* sp. CIB*dtoI*R(pIZ*Tol*R) utilizando piruvato como única fuente de carbono. Se midió el incremento de absorbancia a 600 nm (A_{600}) de *Azoarcus* sp. CIB (rombos), *Azoarcus* sp. CIB*dtoI*R (cuadrados) y *Azoarcus* sp. CIB*dtoI*R(pIZ*Tol*R) (triángulos) cultivados anaeróbicamente en medio mínimo MC con KNO_3 10 mM como aceptor final de electrones y piruvato 0,2 % como fuente de carbono.

Este resultado indica que la inactivación del gen *tolR* genera un retraso en el crecimiento anaeróbico de *Azoarcus* sp. CIB en piruvato, sugiriendo que dicho gen está implicado en la adaptación de *Azoarcus* sp. CIB al metabolismo anaeróbico del piruvato.

Cuando se analizaron al microscopio de contraste de fases las células cultivadas en piruvato, se observó que las de la cepa *Azoarcus* sp. CIB*dtoI*R eran aparentemente más grandes que las de la cepa parental *Azoarcus* sp. CIB (Fig. 42). La complementación de la cepa *Azoarcus* sp. CIB*dtoI*R con el gen *tolR* clonado en pIZ*Tol*R restauraba el tamaño de las células al de la cepa parental (Fig. 42). Mediante el uso del software ImageJ se calculó la longitud celular promedio para cada cepa, obteniéndose una media de $1,81 (\pm 0,35) \mu\text{m}$ para la cepa parental, $2,37 (\pm 0,59) \mu\text{m}$ para la cepa mutante y $1,75 (\pm 0,35) \mu\text{m}$ para la cepa complementada. En conclusión, la inactivación del gen *tolR* produce

un aumento en el tamaño celular de la cepa *Azoarcus* sp. CIBdtolR cultivada anaeróbicamente en piruvato.

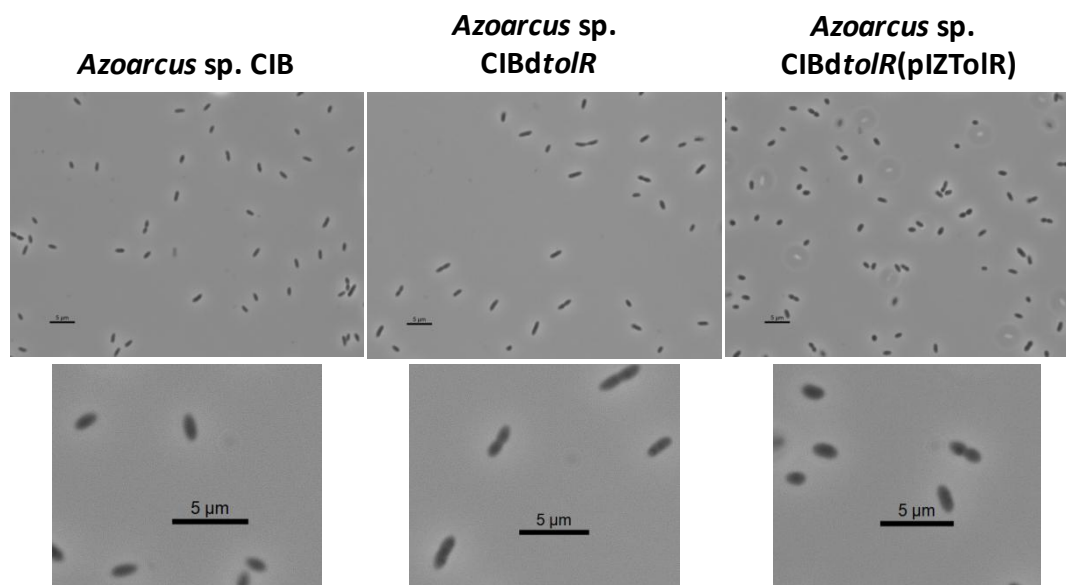


Figura 42. Imágenes al microscopio óptico de las cepas *Azoarcus* sp. CIB, *Azoarcus* sp. CIBdtolR y *Azoarcus* sp. CIBdtolR(pIZtolR). Las células se cultivaron anaeróbicamente en medio mínimo MC con KNO₃ 10 mM como aceptor final de electrones, y con piruvato 0.2% como única fuente de carbono y se tomaron fotografías al microscopio de contraste de fases con el objetivo de 40 aumentos (x400). En la parte inferior de las imágenes se muestra una zona de las mismas aumentada.

3.2.2. El gen *tolR* está implicado en la formación de biopelículas en *Azoarcus* sp. CIB.

En el apartado 2.3, se mostró que la complementación de una cepa de *E. coli* hiperproductora de biopelículas con el plásmido que contiene el gen *tolR* nativo, era capaz de reducir al 50 % la capacidad de formación de la biopelícula (Fig. 25). Esta observación está de acuerdo con el hecho de que TolR posea actividad PDE de di-GMPc ya que se sabe que la disminución de los niveles celulares de este nucleótido reduce la capacidad de formación de biopelículas en bacterias (Hickman y cols., 2005). Por tanto, se analizó si la inactivación del gen *tolR* en el propio *Azoarcus* sp. CIB podría causar la formación de biopelículas. Mientras que la cepa parental *Azoarcus* sp. CIB creciendo anaeróbicamente en piruvato no forma biopelículas claramente detectables, la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIBdtolR forma un depósito a modo de biopelícula estable en el fondo de las botellas de cultivo cuando alcanza la fase estacionaria de crecimiento (Fig.

43). Dado que no se observan estas biopelículas en la cepa mutante *tolR* complementada con el gen *tolR*, parece haber una relación directa entre la inactivación del gen *tolR* y la aparición de este fenotipo.

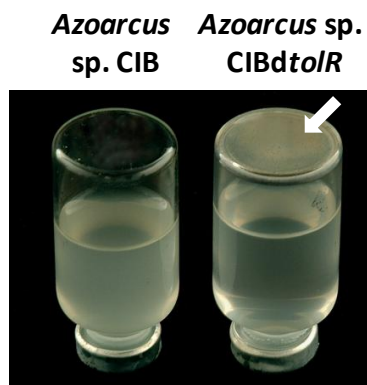


Figura 43. Formación de biopelículas en las cepas *Azoarcus* sp. CIB y *Azoarcus* sp. CIBdtolR. Fotografía de las botellas de cultivo de las cepas *Azoarcus* sp. CIB y *Azoarcus* sp. CIBdtolR crecidas anaeróbicamente hasta alcanzar la fase estacionaria en medio mínimo MC con KNO₃ 10 mM como aceptor final de electrones, y con piruvato 0,2 % como única fuente de carbono. La acumulación de células de *Azoarcus* sp. CIBdtolR formando una biopelícula en el fondo de las botellas se muestra con una flecha.

3.2.3. El gen *tolR* está implicado en la agregación celular en *Azoarcus* sp. CIB.

Dado que TolR funciona como una fosfodiesterasa de di-GMPc, y uno de los efectos más estudiados del incremento de los niveles de di-GMPc como consecuencia de la disrupción de una fosfodiesterasa es la formación de agregados celulares (Römling y cols., 2013), se planteó el estudio de la posible agregación de las células de *Azoarcus* sp. CIBdtolR a lo largo de la curva de crecimiento anaeróbico en piruvato. Como se muestra en la figura 44, las imágenes de microscopía tomadas de la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIBdtolR muestran la presencia de agregados celulares en las etapas tempranas de la curva de crecimiento, que no se observan en la cepa parental *Azoarcus* sp. CIB ni en la cepa complementada *Azoarcus* sp. CIBdtolR(pIZtolR). En la fase exponencial media de la curva de crecimiento los agregados celulares de *Azoarcus* sp. CIBdtolR desaparecen.

Este resultado sugiere que el gen *tolR* interviene regulando la formación de agregados celulares en la fase inicial del crecimiento anaeróbico de *Azoarcus* sp. CIB en piruvato.

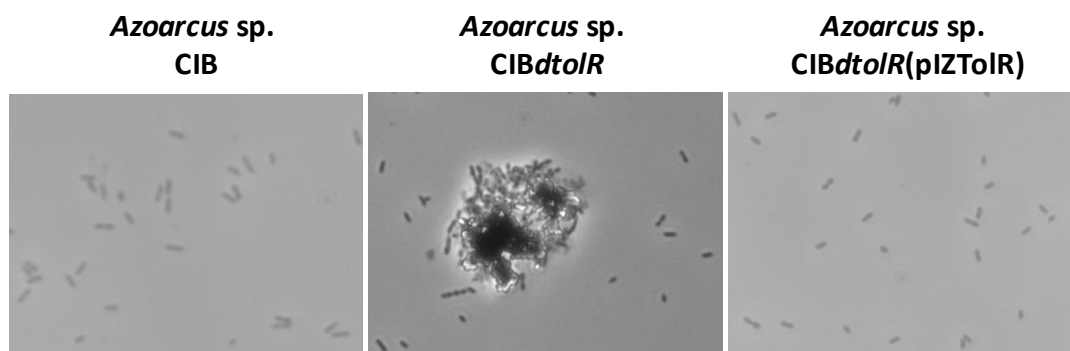


Figura 44. Imágenes al microscopio óptico de cultivos en fase exponencial temprana de las cepas *Azoarcus sp. CIB*, *Azoarcus sp. CIBdtolR* y *Azoarcus sp. CIBdtolR(pIZtolR)*. Las células se crecieron anaeróbicamente en medio mínimo MC con KNO_3 10 mM como aceptor final de electrones, y con piruvato 0.2% como única fuente de carbono. Se tomaron fotografías al microscopio de contraste de fases con el objetivo de 40 aumentos (x400) de cultivos en fase exponencial temprana.

3.3. Análisis transcriptómico comparativo entre la cepa parental *Azoarcus sp. CIB* y la cepa mutante *Azoarcus sp. CIBdtolR*.

Los resultados presentados anteriormente sugieren que el HTCS TolR está implicado en el control de distintos procesos celulares en *Azoarcus sp. CIB*. Esto está de acuerdo con el hecho de que TolR sea una fosfodiesterasa de di-GMPc y que este segundo mensajero esté implicado en numerosas cascadas de señalización celular (Römling y cols., 2013). Dada la complejidad del circuito regulador asociado a los niveles celulares de di-GMPc en bacterias (Schirmer y Jenal, 2009; Römling y cols., 2013), se planteó un abordaje transcriptómico global para tratar de identificar alguno de los posibles genes diana controlados, directa o indirectamente, por TolR en *Azoarcus sp. CIB*.

3.3.1. Secuenciación masiva del mRNA.

Para tratar de identificar alguno de los posibles genes diana controlados por TolR, se comparó el transcriptoma global de la cepa parental *Azoarcus sp. CIB* con el de la cepa mutante *Azoarcus sp. CIBdtolR*, cuando ambas se cultivan anaeróbicamente (en medio mínimo MC con piruvato 0,2 % como fuente de carbono) (condición de actividad basal de TolR) o tras exposición a tolueno 20 mM (condición de actividad inducida de TolR).

Cuando los cultivos alcanzaron la fase exponencial media de crecimiento, se dividieron en dos muestras y a una de ellas se le añadió tolueno 20 mM. Al cabo de 2 h de agitación a 30°C se recogieron los cultivos, se extrajo el RNA y se procedió a la construcción de las librerías de RNA (ver apartado 10.1 de Materiales y Métodos). Se realizaron dos réplicas biológicas de cada condición, por lo que en total se procesaron 8 muestras para secuenciación masiva. Las muestras se procesaron mediante el kit *Encore Complete Prokaryotic RNA-Seq DR Multiplex System 1–8 kit* (NuGen). Resumidamente, los RNAs se retrotranscribieron a cDNA y éste se fraccionó para generar fragmentos de 150 pb a los que se ligaron adaptadores específicos del sistema Illumina. Posteriormente se realizó una selección de la hebra codificante y se amplificó. La secuenciación masiva del mRNA se realizó mediante el sistema de Illumina.

3.3.2. Análisis de las lecturas y normalización de las muestras.

Tras la secuenciación masiva del mRNA, se realizó un análisis de la calidad de las lecturas crudas obtenidas, de 36 nt de longitud, mediante el programa FastQC (Babraham Institute), que determinó que la calidad de las lecturas (escala Phred33) se mantiene en valores aceptables a lo largo de su longitud. Asimismo se realizó el alineamiento de las lecturas contra el genoma de referencia de *Azoarcus* sp. CIB, utilizando sólo las secuencias que presentaban cero *mismatches*, distribuyendo al azar las lecturas que alineaban en más de una región del genoma. De esta forma, las lecturas están homogéneamente distribuidas y sin sesgo, sin restringir el alineamiento a ninguna de las dos hebras. Cuando éstas se alineaban en el visualizador de genomas IGV (*Integrative Genome Viewer*; Robinson, 2011), y a pesar de que los alineamientos eran “ciegos” a la selección de hebra, se observó una buena correlación de la orientación de las lecturas con los *Open Reading Frames (ORFs)* anotados.

Para poder hacer comparaciones entre muestras, es necesario normalizar los datos por cantidad total de lecturas mapeadas (rendimiento de la librería), y por tamaño del gen, ya que existe una gran dependencia entre éste y el número de lecturas debido al proceso de preparación de librerías para RNAseq. Por ello, se procedió a la cuantificación y normalización de las muestras, es decir, a la asignación de lecturas a cada locus y a calcular el valor de RPKM (*Reads Per Kb of transcript per Million mapped reads*) mediante el programa EDGE-pro (Magoc, 2013), específicamente diseñado para

Resultados

transcriptómica de bacterias, que utiliza la anotación proporcionada para cuantificar las ORF y eliminar los rRNA y tRNA en el cálculo de los niveles de RPKM (Tabla 4).

| Muestra | Nº lecturas totales | Mapeadas en genoma | Lecturas únicas | Lecturas múltiples |
|----------------|------------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|
| CIB pir 1 | 7.769.159 | 7.466.036 (96,10%) | 2.884.731 (37,13%) | 4.581.305 (58,97%) |
| CIB tol 1 | 10.367.116 | 10.117.918 (97,60%) | 4.520.583 (43,61%) | 5.597.335 (53,99%) |
| CIBdtoIR pir 1 | 6.131.386 | 5.820.959 (94,94%) | 2.608.149 (42,54%) | 3.212.810 (52,40%) |
| CIBdtoIR tol 1 | 11.587.343 | 11.294.120 (97,47%) | 5.814.818 (50,18%) | 5.479.302 (47,29%) |
| CIB pir 2 | 11.141.384 | 10.955.836 (98,36%) | 4.668.168 (41,90%) | 6.290.668 (56,46%) |
| CIB tol 2 | 9.491.199 | 9.269.951 (97,67%) | 4.811.709 (50,70%) | 4.458.242 (46,97%) |
| CIBdtoIR pir 2 | 12.239.213 | 11.188.912 (91,42%) | 4.229.295 (34,56%) | 6.959.617 (56,86%) |
| CIBdtoIR tol 2 | 3.499.617 | 3.314.862 (94,72%) | 1.586.880 (45,34%) | 1.727.982 (49,38%) |

Tabla 4. Estadísticas de la secuenciación masiva de RNA de las dos muestras 1 y 2 de *Azoarcus* sp. CIB (CIB) y del mutante *Azoarcus* sp. CIBdtoIR (CIBdtoIR) cultivadas en piruvato (pir) o tras exposición a tolueno 20 mM (tol). La distribución de los alineamientos de las lecturas se realizó con el programa EDGE-pro.

A pesar de que la preparación de las muestras mediante el protocolo de NuGEN conlleva información sobre la dirección de la transcripción, en el análisis realizado no se diferencian las dos hebras y no se ha tenido en cuenta.

Como primera aproximación a la descripción del transcriptoma obtenido, podemos observar en un mapa de calor (obtenido con el programa *R statistical package*), una representación de los 3099 genes que presentan en todas las muestras promediadas un RPKM>0, es decir, eliminando aquellos genes, 808, que en alguna de las muestras promediadas no muestran expresión, y también los 832 restantes que en ambas muestras no aparecen expresados. Así, esta representación, que mantiene el orden de los genes según su anotación en el genoma, refleja un 65,4 % del total de los genes codificantes de proteínas anotados (4739 genes) y muestra un perfil de expresión característico y diferente en cada condición (Fig. 45).

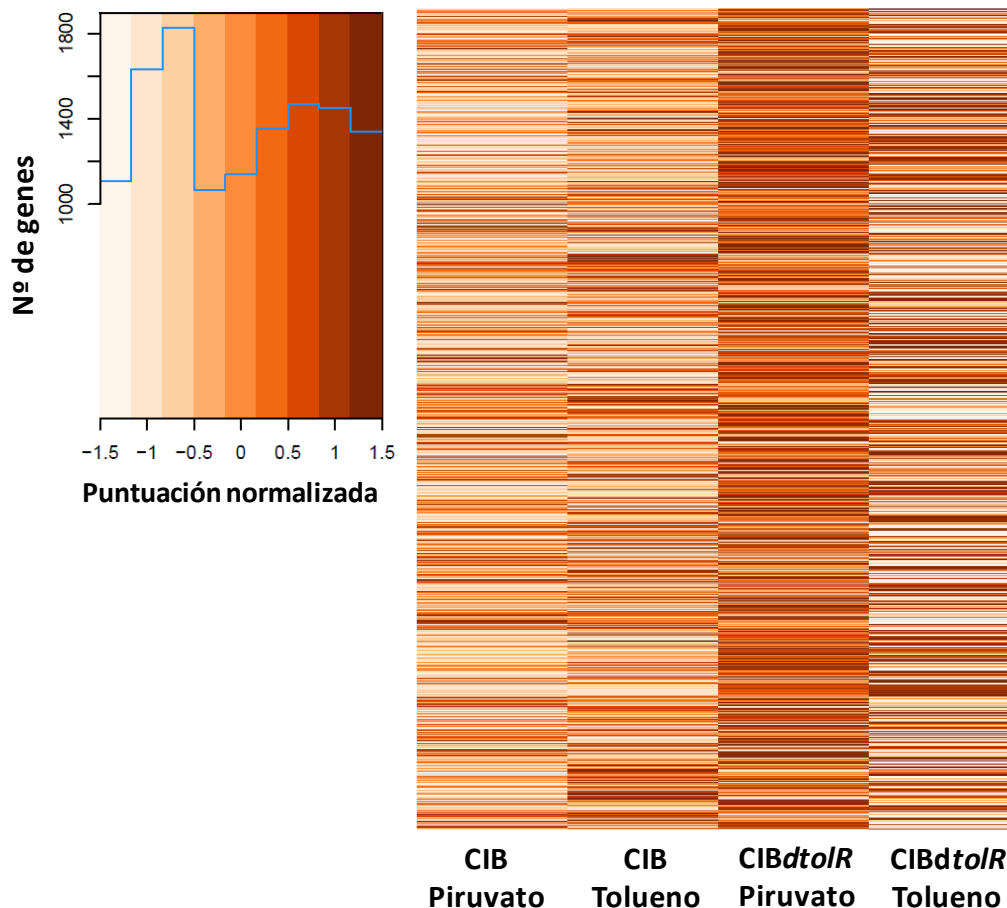


Figura 45. Representación global de los genes con RPKM > 0 seleccionados del análisis transcriptómico comparativo entre *Azoarcus* sp. CIB (CIB) y *Azoarcus* sp. CIBdtolR (CIBdtolR) cultivados en piruvato (Piruvato) o tras exposición a una concentración tóxica de tolueno 20 mM (Tolueno). Se muestra la distribución de genes por rangos de expresión desde la mínima (blanco) hasta la máxima (marrón).

3.3.3. Análisis de los genes diferencialmente expresados entre la cepa parental *Azoarcus* sp. CIB y la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIBdtolR.

Se procedió al análisis de expresión diferencial de los genes usando los valores de RPKM calculados y promediados entre las dos réplicas biológicas y comparando siempre la cepa mutante frente a la parental, por un lado creciendo en piruvato (actividad TolR basal), y por otro lado tras el choque de tolueno (actividad TolR inducida).

En primer lugar, se analizó la distribución de los niveles de expresión en cada condición, teniendo en cuenta los valores promedio de los genes con valores de RPKM > 0, y sólo los genes que presentan una diferencia de expresión de > 2 ó $< 0,5$.

veces, representando por separado los que se sobreexpresan y los que se reprimen en la cepa mutante respecto a la cepa parental (Fig. 46). Cabe destacar que, en las dos condiciones a estudio, el número de genes sobreexpresados en cada uno de los rangos descritos fue similar, mientras que el número de genes reprimidos es claramente superior en todos los rangos en la condición de choque con tolueno.

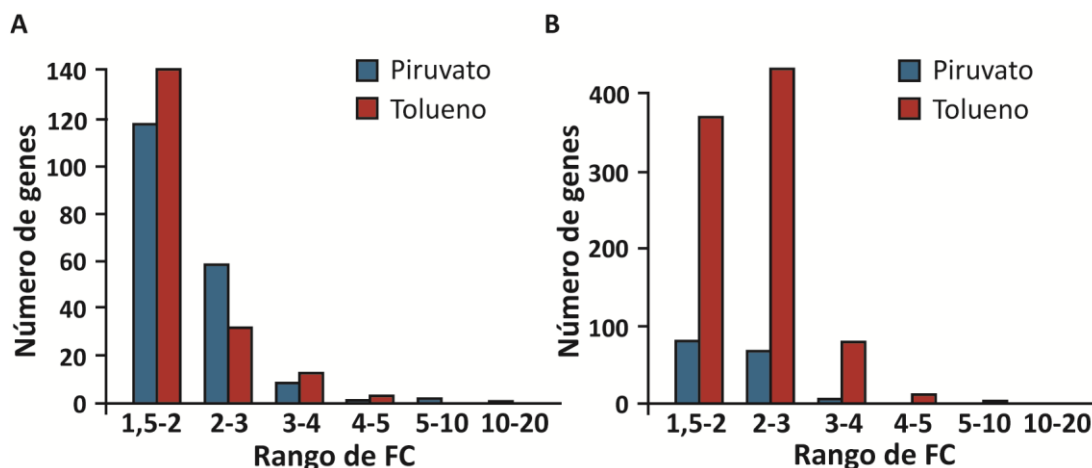


Figura 46. Distribución de los rangos de expresión de los genes, expresado como *Fold Change* (FC), sobreexpresados (A) o reprimidos (B) en la cepa mutante *Azoarcus* sp CIBdtolR con respecto a la cepa parental *Azoarcus* sp. CIB. Se muestran los rangos de expresión diferencial, medidos como número de veces de cambio (*Fold Change*, FC) en las condiciones de crecimiento en piruvato (barras azules) y tras un choque de tolueno (barras rojas).

El mayor número de genes diferencialmente expresados en la situación de tratamiento con tolueno, está de acuerdo con el hecho de que en esta situación se induce la actividad de TolR y, por lo tanto, se espera también un mayor impacto de esta proteína en la fisiología de la célula.

Otro análisis que nos permite hacernos una idea de cómo la expresión de la cepa mutante se separa del comportamiento mostrado por la cepa parental son las gráficas de dispersión que contienen los datos de RPKM expresados como logaritmo decimal, y donde se tiene en cuenta no sólo el nivel de expresión sino la probabilidad de equivocarse en el análisis realizado, medida como el valor de FDR (*False Discovery Rate*) (escala color) (Fig. 47). En estas gráficas los valores de interés serían los que se acerquen al azul, el resto tiene un valor de FDR inasumible, quedando representados hacia la izquierda de la diagonal los genes que se sobreexpresan, y hacia la derecha los que se reprimen en la cepa mutante frente a la parental.

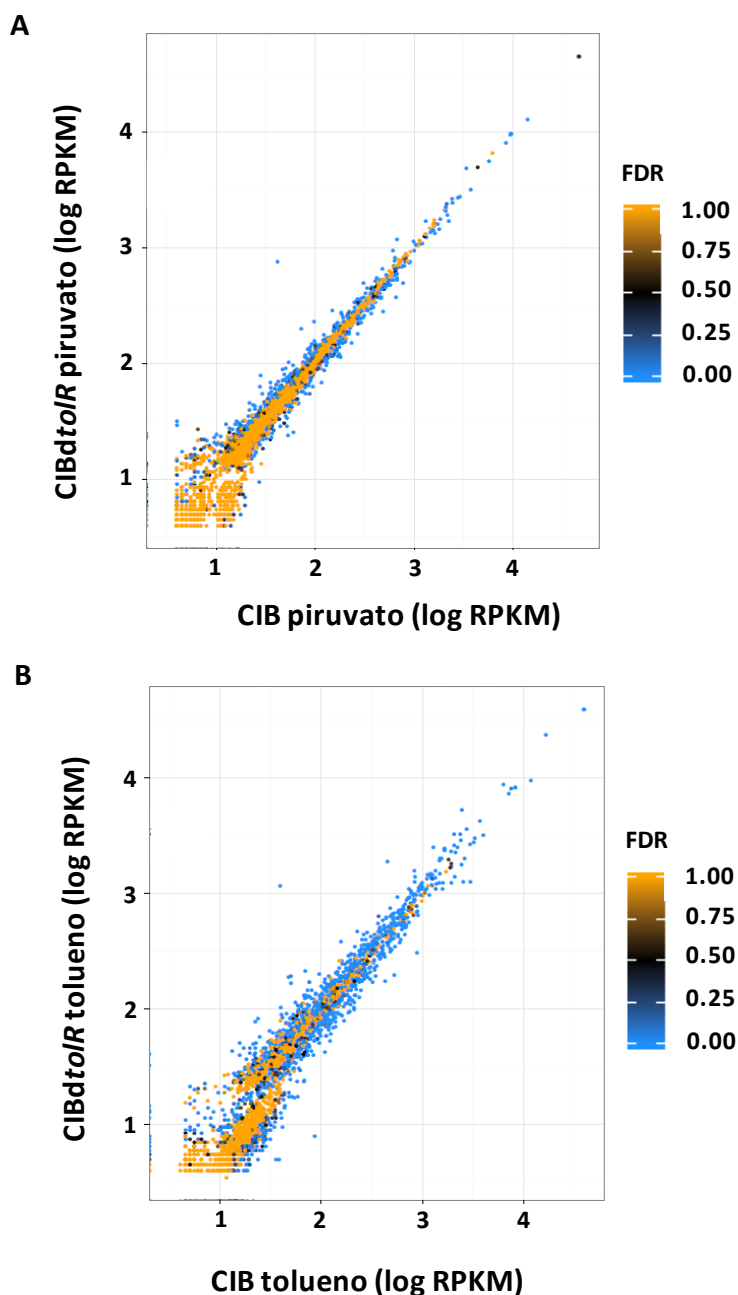


Figura 47. Gráficas de dispersión de los genes expresados al comparar la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIBdto/R con la cepa parental *Azoarcus* sp. CIB en piruvato (A) o tras el choque de tolueno (B). Se presentan los datos de expresión génica obtenidos como el logaritmo decimal del valor de RPKM en la cepa parental (en el eje de abscisas) y en la cepa mutante (en el eje de ordenadas). La probabilidad de equivocarse en el análisis realizado (FDR), se indica en una escala de color que va del naranja (alta probabilidad) al azul (baja probabilidad). Los puntos azules son los valores de expresión diferencial que se consideran creíbles.

Comparando las gráficas de las dos condiciones experimentales analizadas podemos destacar que tras el choque con tolueno (Fig. 47B) hay bastante más dispersión de puntos que en la condición de piruvato (Fig. 47A), lo que nos indica que el cambio

Resultados

entre ambas cepas en esta condición es mayor y afecta a más genes, y además hay más puntos azules que en la condición basal de piruvato, lo que revela una mayor certeza en los cambios observados.

De esta forma, se consideró que un gen estaba diferencialmente expresado (DEG) cuando su valor promedio RPKM en una condición mostraba una variación (*Fold Change*) de > 2 veces (sobreexpresado) ó $< 0,5$ veces (reprimido) en la cepa mutante respecto a la cepa parental. Es decir, se consideraron DEG aquellos genes que están expresados en una de las cepas a valores que son al menos el doble o la mitad que en la otra cepa, y que tienen un valor de *p-value* ajustado (Audic y Claverie, 1997) mediante FDR inferior a 0,05 (Benjamini y cols., 2001), es decir, asumiendo la probabilidad de equivocarse una de cada 20 veces que se haga el análisis. Así, se obtuvieron un total de 213 DEG, de los cuales un total de 31 genes se detectaban en la condición de crecimiento en piruvato, 172 DEG en la condición de choque de tolueno, y 10 DEG eran comunes en ambas condiciones (Fig. 48).

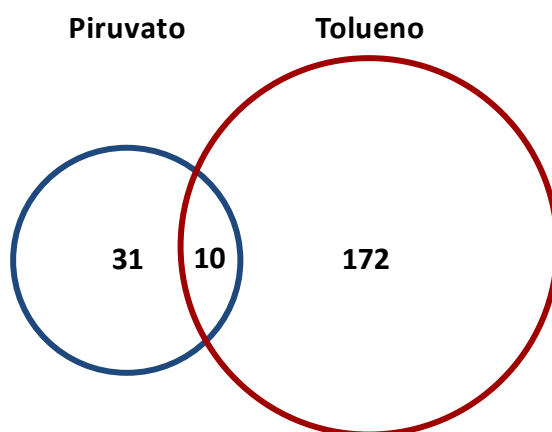


Figura 48. Diagrama en el que se muestra el número de genes diferencialmente expresados (DEG) cuando se compara la cepa *Azoarcus* sp. CIB parental y la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB*dtolR* cultivadas en piruvato (piruvato) o tras un choque de tolueno (tolueno).

En las Tablas 5 y 6 se resumen los genes seleccionados en cada condición, con su número de identificación y función asignada, la categoría COG, el número de veces de inducción (en rojo) / represión (en verde), expresados como *Fold Change*, y el FDR.

Tabla 5. Genes diferencialmente expresados (DEG) al comparar la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIBdtolR con la cepa parental *Azoarcus* sp. CIB cultivadas en piruvato*.

| Gene | Función asignada | Categoría COG | Fold Change | FDR |
|------------|--|------------------|----------------|----------|
| AzCIB_3894 | proteína hipotética azo3464 | S | 2,60E+01 | 2,56E-04 |
| AzCIB_3295 | proteína hipotética AZKH_1208 | R | 2,45E+01 | 1,24E-27 |
| AzCIB_0496 | proteína hipotética Pfl01_0482 | | 2,40E+01 | 1,12E-13 |
| AzCIB_1234 | proteína hipotética AZKH_0230 | S | 1,83E+01 | 0,00E+00 |
| AzCIB_1982 | receptor putativo TonB-dependiente | P | 1,50E+01 | 6,63E-10 |
| AzCIB_1233 | fosfolípido/glicerol aciltransferasa | I | 1,40E+01 | 3,52E-09 |
| AzCIB_3504 | proteína hipotética AZKH_3447 | O | 1,00E+01 | 2,43E-28 |
| AzCIB_2593 | proteína de reparación de DNA | L | 9,00E+00 | 1,67E-02 |
| AzCIB_1836 | galactosiltransferasa I (síntesis núcleo LPS) | M | 8,50E+00 | 8,51E-04 |
| AzCIB_3446 | metalofofoesterasa | S | 8,50E+00 | 1,01E-02 |
| AzCIB_3294 | proteína hipotética AZKH_1209 | | 8,00E+00 | 6,50E-20 |
| AzCIB_1065 | lisina 2,3-aminomutasa | E | 7,50E+00 | 2,11E-06 |
| AzCIB_3290 | proteína hipotética AZKH_1213 | | 7,37E+00 | 2,33E-28 |
| AzCIB_3102 | proteína transmembrana ferredoxina 4Fe-4S | C | 7,00E+00 | 1,51E-03 |
| AzCIB_4598 | MCP transductor de señal con sensor Cache | N, T | 7,00E+00 | 6,41E-03 |
| AzCIB_0356 | metilmalonato-semialdehído deshidrogenasa (MmsA) | C | 5,50E+00 | 2,16E-02 |
| AzCIB_1665 | transportador ABC, extrusión (periplasma) | P | 5,00E+00 | 3,49E-02 |
| AzCIB_2179 | simporte nitrato/proton | P | 5,00E+00 | 3,58E-05 |
| AzCIB_1235 | regulador transcripcional, familia LysR | K | 3,89E+00 | 9,22E-06 |
| AzCIB_3764 | proteína hipotética AZKH_3692 | | 2,84E+00 | 4,38E-13 |
| AzCIB_2025 | proteína de reparación de DNA, RadA | O | 2,82E+00 | 3,61E-02 |
| AzCIB_3381 | proteína hipotética AZKH_3330 | | 2,82E+00 | 4,05E-04 |
| AzCIB_3763 | proteína hipotética ebA4143 | R | 2,81E+00 | 1,22E-61 |
| AzCIB_0458 | proteína hipotética AZKH_0540 | S | 2,69E+00 | 1,22E-03 |
| AzCIB_0046 | Histidina quinasa, con dominio HAMP | T | 2,45E+00 | 8,38E-10 |
| AzCIB_4537 | proteína hipotética Rpic12D_0672 | | 2,42E+00 | 1,95E-06 |
| AzCIB_3445 | proteína hélice-giro-hélice, CopG | | 2,40E+00 | 3,53E-02 |
| AzCIB_0834 | proteína hipotética AZKH_0954 | | 2,38E+00 | 1,30E-27 |
| AzCIB_1357 | proteína hipotética Tmz1t_2119 | | 2,29E+00 | 3,33E-03 |
| AzCIB_3296 | glicerol-3-fosfato deshidrogenasa | C | 2,25E+00 | 4,65E-05 |
| AzCIB_2381 | proteína hipotética AZKH_p0618 | | 2,21E+00 | 3,65E-03 |
| AzCIB_3018 | proteína hipotética AZKH_3091 | | 2,14E+00 | 1,26E-03 |
| AzCIB_1983 | proteína hipotética ebA6147 | S | 2,12E+00 | 5,45E-05 |
| AzCIB_0203 | proteína hipotética ebA4524 | R | 2,05E+00 | 6,81E-04 |
| AzCIB_2181 | nitrato reductasa 1, subunidad alfa | C | 2,04E+00 | 7,65E-14 |
| AzCIB_0032 | proteína hipotética HRM2_34780 | | 4,53E-01 | 5,64E-14 |
| AzCIB_3336 | proteína hipotética azo0999 | | 4,25E-01 | 1,34E-05 |
| AzCIB_3704 | proteína hipotética AZKH_3633 | | 3,52E-01 | 5,18E-03 |
| AzCIB_1624 | bomba de extrusión de metales pesados, familia CzcA | P | 1,43E-01 | 3,86E-02 |
| AzCIB_1585 | transportador ABC de aminoácidos ramificados, proteína de unión a ATP (BraF) | E | 1,25E-01 | 3,98E-02 |
| AzCIB_3609 | proteína hipotética ebA889 | S | 5,71E-02 | 3,59E-02 |

Resultados

Tabla 6. Genes diferencialmente expresados (DEG) al comparar la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIBdtolR con la cepa parental *Azoarcus* sp. CIB en la condición de choque de tolueno*.

| Gen | Función asignada | Categoría COG | Fold Change | FDR |
|------------|--|---------------|-------------|-----------|
| AzCIB_3290 | proteína hipotética AZKH_1213 | | 4,15E+01 | 4,24E-11 |
| AzCIB_1233 | fosfolípido/glicerol aciltransferasa | I | 3,35E+01 | 3,37E-67 |
| AzCIB_1234 | proteína hipotética AZKH_0230 | S | 2,95E+01 | 0,00E+00 |
| AzCIB_1271 | proteína de biosíntesis de pirroloquinolina quinona C | H | 1,55E+01 | 6,13E-14 |
| AzCIB_3295 | proteína hipotética AZKH_1208 | R | 1,45E+01 | 3,31E-03 |
| AzCIB_0495 | proteína hipotética azo3576 | M | 1,25E+01 | 2,03E-18 |
| AzCIB_2426 | Enoil-CoA hidratasa/isomerasa | I | 9,00E+00 | 1,27E-03 |
| AzCIB_3343 | proteína hipotética AZKH_1104/ glutamate-5-kinase | N, U | 9,00E+00 | 2,74E-02 |
| AzCIB_1570 | proteína de unión a GTP | R | 8,50E+00 | 3,56E-02 |
| AzCIB_1166 | glicina deshidrogenasa (GcvP) | E | 8,00E+00 | 1,52E-08 |
| AzCIB_1835 | proteína de biosíntesis de oligosacáridos tipo Alg14 | M | 8,00E+00 | 2,27E-03 |
| AzCIB_0497 | piruviltransferasa | | 7,50E+00 | 3,30E-03 |
| AzCIB_0322 | proteína hipotética AZKH_0397 | M | 7,00E+00 | 1,82E-06 |
| AzCIB_1946 | ciclohexanocarboxil-CoA deshidrogenasa | I | 7,00E+00 | 1,60E-04 |
| AzCIB_0161 | proteína hipotética SinacDRAFT_3220 | | 6,50E+00 | 7,25E-04 |
| AzCIB_0193 | proteína hipotética TOL2_C41290 | | 6,50E+00 | 4,07E-04 |
| AzCIB_1916 | proteína de membrana externa | M | 6,50E+00 | 1,24E-03 |
| AzCIB_3721 | proteína hipotética AZKH_3641 | T | 6,00E+00 | 1,50E-04 |
| AzCIB_0546 | proteína putativa transportador ABC | V | 5,50E+00 | 8,22E-04 |
| AzCIB_1075 | proteína de la familia Citocromo c | C | 5,50E+00 | 2,62E-02 |
| AzCIB_0781 | proteína-glutamina N-metiltransferasa | J | 5,00E+00 | 1,65E-02 |
| AzCIB_1047 | hidrolasa Zn-dependiente | R | 5,00E+00 | 1,75E-05 |
| AzCIB_1250 | proteína putativa de señalización transduccional con dominio CBS | T | 5,00E+00 | 2,77E-02 |
| AzCIB_1619 | transportador ABC de aminoácidos ramificados, proteína permeasa | E | 5,00E+00 | 4,61E-03 |
| AzCIB_1907 | proteína de la familia Citocromo c | | 5,00E+00 | 5,27E-05 |
| AzCIB_3230 | proteína ClpV1 | O | 5,00E+00 | 1,26E-03 |
| AzCIB_3381 | proteína hipotética AZKH_3330 | | 4,30E+00 | 7,99E-03 |
| AzCIB_0527 | ácidos grasos-ACP hidrolasa (CycA) | S | 4,19E+00 | 0,00E+00 |
| AzCIB_1722 | proteína hipotética Lcho_0142 | | 4,03E+00 | 1,78E-71 |
| AzCIB_1721 | proteína hipotética Pnap_4568 | M | 3,83E+00 | 3,30E-183 |
| AzCIB_3966 | sistema de extrusión cobre/plata, componente de membrana | P | 3,64E+00 | 3,02E-09 |
| AzCIB_1269 | proteína de biosíntesis de pirroloquinolina quinona A | | 3,52E+00 | 2,66E-11 |
| AzCIB_1720 | bomba de extrusión de metales pesados, familia CzcA | P | 3,49E+00 | 1,10E-253 |
| AzCIB_1902 | 3-hidroxiacil-(ACP) deshidratasa | I | 3,35E+00 | 3,00E-08 |
| AzCIB_1723 | proteína de extrusión de membrana externa | M, U | 3,30E+00 | 8,41E-68 |
| AzCIB_0496 | proteína hipotética Pfl01_0482 | | 3,29E+00 | 1,19E-26 |
| AzCIB_1719 | proteína hipotética MW7_1445 | | 3,09E+00 | 4,88E-88 |
| AzCIB_1270 | proteína de biosíntesis de pirroloquinolina quinona B | R | 3,00E+00 | 9,19E-15 |
| AzCIB_1170 | transportador D-serina/D-alanina/glicina | E | 2,91E+00 | 7,51E-21 |
| AzCIB_4432 | transportador tipo ABC-2 | V | 2,71E+00 | 4,18E-15 |

Resultados

| | | | | |
|------------------|--|------|----------|-----------|
| AzCIB_3753 | sistema transportador de C4-dicarboxilato, permeasa, subunidad pequeña | G | 2,58E+00 | 8,20E-50 |
| AzCIB_4516 | TolR | T | 2,55E+00 | 5,70E-39 |
| AzCIB_4437 | proteína de resistencia a acriflavina | V | 2,45E+00 | 1,90E-275 |
| AzCIB_1083 | sistema de transporte unión a proteína dependiente, componente de membrana interna | P | 2,44E+00 | 6,51E-08 |
| AzCIB_1725 | sistema de extrusión de cationes, proteína transmembrana | M, S | 2,38E+00 | 5,23E-14 |
| AzCIB_1724 | sistema de extrusión cobre/plata, componente de membrana | P | 2,35E+00 | 5,70E-25 |
| AzCIB_4433 | transportador tipo ABC-2 | V | 2,33E+00 | 2,33E-10 |
| AzCIB_3763 | proteína hipotética ebA4143 | R | 2,25E+00 | 2,76E-58 |
| AzCIB_4440 | proteína hipotética ACD_23C01198G0002 | H | 2,24E+00 | 1,97E-06 |
| AzCIB_0834 | proteína hipotética AZKH_0954 | | 2,24E+00 | 1,11E-02 |
| AzCIB_4434 | ATPasa transportadora de monosacáridos | V, R | 2,24E+00 | 1,41E-32 |
| AzCIB_4553 | proteína hipotética BN117_0550 | | 2,16E+00 | 2,24E-02 |
| AzCIB_1623 | proteína hipotética MW7_1445 | | 2,13E+00 | 5,77E-05 |
| AzCIB_0341 | proteína 1,2-fenilacetil-CoA epoxidasa (NADPH) 2 | R | 2,12E+00 | 2,90E-83 |
| AzCIB_3764 | proteína hipotética AZKH_3692 | | 2,11E+00 | 9,26E-12 |
| AzCIB_1085 | proteína relacionada con transportador ABC transporter | V | 2,09E+00 | 3,73E-18 |
| AzCIB_3233 | proteína hipotética Daro_2174 | S | 2,08E+00 | 1,99E-05 |
| AzCIB_4737 | proteína hipotética ebB89 | S | 2,08E+00 | 1,91E-14 |
| AzCIB_2031 | proteína hipotética AZKH_2735 | | 2,06E+00 | 4,30E-02 |
| AzCIB_tRNA_Gly_2 | Anticodon GCC | | 2,06E+00 | 3,74E-16 |
| AzCIB_1687 | proteína hipotética Tmz1t_2100 | | 2,06E+00 | 3,02E-03 |
| AzCIB_3543 | proteína hipotética AZKH_3481 | S | 2,04E+00 | 6,55E-08 |
| AzCIB_1589 | regulador transcripcional, familia GntR | K | 2,01E+00 | 1,57E-24 |
| AzCIB_3153 | cisteína sintasa A | E | 4,96E-01 | 7,57E-54 |
| AzCIB_2893 | proteína hipotética Z2823 | T | 4,96E-01 | 1,51E-82 |
| AzCIB_3943 | proteína hipotética AZKH_3895 | P | 4,92E-01 | 1,70E-277 |
| AzCIB_2664 | acil-CoA sintetasa | C, M | 4,89E-01 | 3,18E-157 |
| AzCIB_2273 | Fasina | | 4,82E-01 | 1,94E-17 |
| AzCIB_4090 | propionil-CoA carboxilasa cadena beta, precursor mitocondrial (PccB) | I | 4,80E-01 | 4,35E-02 |
| AzCIB_4074 | cytochrome c, clase I | C | 4,74E-01 | 8,89E-27 |
| AzCIB_3971 | proteína de secreción general H | N, U | 4,72E-01 | 7,16E-26 |
| AzCIB_2524 | proteína hipotética de exporte | | 4,47E-01 | 4,04E-02 |
| AzCIB_1405 | proteína hipotética NSU_4612 | | 4,36E-01 | 1,42E-08 |
| AzCIB_1415 | proteína hipotética MCP_0952 familia 2 glicosil transferasa | H, M | 4,29E-01 | 2,53E-02 |
| AzCIB_0639 | proteína hipotética AZKH_0738 | | 4,21E-01 | 0,00E+00 |
| AzCIB_0062 | proteína putativa formato deshidrogenasa, subunidad gamma (FdHc) | C | 4,17E-01 | 1,59E-02 |
| AzCIB_0277 | cytochrome c, clase I | C | 4,09E-01 | 8,69E-04 |
| AzCIB_0069 | transportador ABC putativo, receptor de glutamato (GltI) | E, T | 4,07E-01 | 1,77E-191 |
| AzCIB_3269 | proteína hipotética ebA826 | | 4,00E-01 | 2,09E-02 |

Resultados

| | | | | |
|------------|--|---------|----------|----------|
| AzCIB_0250 | proteína hipotética AZKH_0322 | R | 4,00E-01 | 2,70E-02 |
| AzCIB_4247 | regulador de respuesta con dominios diguanilato ciclasa/fosfodiesterasa con sensor PAS/PAC | T | 3,93E-01 | 3,29E-04 |
| AzCIB_1041 | glutathione S-transferasa | O | 3,92E-01 | 1,74E-29 |
| AzCIB_3425 | 2-isopropilmalato sintasa | E | 3,73E-01 | 0,00E+00 |
| AzCIB_3914 | transportador ABC, extrusión (periplasma) | V | 3,71E-01 | 1,22E-02 |
| AzCIB_0692 | histidina quinasa híbrida | T | 3,68E-01 | 2,16E-03 |
| AzCIB_0078 | 16S rRNA metiltransferasa | M | 3,68E-01 | 5,36E-03 |
| AzCIB_3049 | acetolactato sintasa I, subunidad grande | E, H | 3,65E-01 | 2,60E-02 |
| AzCIB_1596 | proteína hipotética AZKH_2126 | T | 3,57E-01 | 4,38E-02 |
| AzCIB_1972 | proteína putativa inosín-5-monofosfato deshidrogenasa | T | 3,56E-01 | 6,76E-04 |
| AzCIB_2887 | piruvato oxidoreductasa | C | 3,53E-01 | 6,96E-07 |
| AzCIB_2352 | proteína putativa histidina quinasa | T | 3,51E-01 | 1,32E-03 |
| AzCIB_2952 | aspartato amonio-liasas | E | 3,51E-01 | 1,22E-54 |
| AzCIB_1926 | proteína MCP | N, T | 3,50E-01 | 9,45E-05 |
| AzCIB_3872 | esterasa | R | 3,48E-01 | 4,81E-02 |
| AzCIB_4658 | proteína hipotética AZKH_4548 | | 3,45E-01 | 1,76E-02 |
| AzCIB_4644 | proteína asociada a gránulo | | 3,44E-01 | 0,00E+00 |
| AzCIB_2258 | MCP metiltransferasa/metilesterasa, CheR/CheB | N, T, D | 3,44E-01 | 3,14E-03 |
| AzCIB_0976 | proteína tipo flagelar (Flit) | | 3,43E-01 | 1,45E-02 |
| AzCIB_3409 | proteína de secreción general A | U | 3,42E-01 | 1,32E-02 |
| AzCIB_0430 | acil-CoA deshidrogenasa | I | 3,41E-01 | 3,34E-02 |
| AzCIB_0575 | regulador de respuesta de asimilación de nitrógeno | T | 3,41E-01 | 3,23E-02 |
| AzCIB_3978 | proteína putativa aminotransferasa | E | 3,33E-01 | 2,62E-02 |
| AzCIB_0409 | simportador sodio/soluto symporter | E, R | 3,33E-01 | 5,98E-05 |
| AzCIB_2108 | glutathione S-transferasa | O | 3,33E-01 | 1,60E-04 |
| AzCIB_4234 | proteasa dependiente de ATP, subunidad peptidasa | O | 3,26E-01 | 5,37E-03 |
| AzCIB_0454 | proteína hipotética azo0576 | R | 3,20E-01 | 8,97E-04 |
| AzCIB_1459 | glicosil hidrolasa | R | 3,20E-01 | 1,40E-02 |
| AzCIB_1074 | proteína hipotética RPSI07_mp1449 | I | 3,18E-01 | 1,87E-02 |
| AzCIB_2741 | proteína putativa histidina quinasa | T | 3,18E-01 | 5,63E-05 |
| AzCIB_0767 | diguanilato ciclasa/fosfodiesterasa | T | 3,17E-01 | 2,19E-02 |
| AzCIB_4727 | proteína hipotética AZKH_4602 | | 3,17E-01 | 2,81E-02 |
| AzCIB_0395 | peptidasa familia U32 | O | 3,16E-01 | 3,20E-05 |
| AzCIB_1216 | proteína hipotética Rfer_1020 | T | 3,15E-01 | 1,02E-03 |
| AzCIB_1501 | regulador transcripcional, familia LuxR | K | 3,13E-01 | 4,36E-02 |
| AzCIB_0419 | proteína tipo adhesina de membrana externa | | 3,11E-01 | 3,81E-21 |
| AzCIB_0020 | diguanilato ciclasa/fosfodiesterasa con sensor PAS/PAC | K, T | 3,10E-01 | 6,07E-14 |
| AzCIB_2287 | proteína hipotética SCD_01825 | K, T | 3,08E-01 | 2,24E-05 |
| AzCIB_0418 | glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD | E | 3,06E-01 | 5,54E-06 |
| AzCIB_2316 | regulador transcripcional, familia LacI | K | 3,06E-01 | 7,48E-03 |
| AzCIB_2562 | proteína hipotética eba377 | | 3,04E-01 | 2,52E-03 |
| AzCIB_0255 | proteína hipotética AZKH_0327 | | 3,04E-01 | 3,52E-04 |
| AzCIB_3354 | glicosil transferasa, proteína tipo UDP-glucuronosiltransferasa | G, C | 3,04E-01 | 6,24E-05 |

Resultados

| | | | | |
|------------|---|---------|----------|----------|
| AzCIB_3849 | transportador de extrusión, familia RND | V | 3,03E-01 | 3,45E-05 |
| AzCIB_0618 | proteína con dominio de unión a metal tipo hemeritina | P | 3,02E-01 | 4,77E-06 |
| AzCIB_0857 | proteína hipotética AZKH_0982 | S | 3,00E-01 | 6,62E-04 |
| AzCIB_4408 | 2-hidroxi-6-cetononotrienodioato hidrolasa | R | 2,97E-01 | 7,40E-03 |
| AzCIB_0234 | quinol deshidrogenasa, cpmonente de periplasma (NapG) | C | 2,93E-01 | 3,83E-02 |
| AzCIB_0125 | regulador de respuesta | K, T | 2,90E-01 | 7,78E-05 |
| AzCIB_0929 | proteína de biosíntesis de ubiquinona (Coq7) | H | 2,90E-01 | 1,55E-02 |
| AzCIB_1294 | regulador transcripcional, familia LysR | K | 2,88E-01 | 1,01E-06 |
| AzCIB_3109 | deshidrogenasa de cadena corta | I, Q, R | 2,86E-01 | 5,69E-03 |
| AzCIB_3335 | glicolata oxidasa, subunidad de unión a FAD | C | 2,83E-01 | 1,03E-03 |
| AzCIB_4250 | transportador ABC de aminoácidos ramificados, proteína de unión a ATP | E | 2,79E-01 | 2,89E-04 |
| AzCIB_4080 | metilmalonil-CoA mutasa (MutA) | I, E | 2,79E-01 | 2,71E-11 |
| AzCIB_0349 | regulador transcripcional, familia LysR | K | 2,78E-01 | 5,11E-03 |
| AzCIB_0018 | sensor TCS | T | 2,68E-01 | 1,60E-02 |
| AzCIB_1298 | hidrolasa dependiente de Zn | R | 2,64E-01 | 1,11E-05 |
| AzCIB_2060 | proteína hipotética AZKH_2763 | S | 2,50E-01 | 9,22E-05 |
| AzCIB_4197 | proteína putativa tipo pirina | R | 2,50E-01 | 4,07E-03 |
| AzCIB_2410 | succinato deshidrogenasa, subunidad Fe-S | C | 2,45E-01 | 2,23E-03 |
| AzCIB_2302 | deshidrogenasa/reductasa de cadena corta SDR | I, Q, R | 2,42E-01 | 1,32E-05 |
| AzCIB_0539 | proteína hipotética AZKH_0631 | E | 2,37E-01 | 4,89E-04 |
| AzCIB_2563 | proteína tipo partición del cromosoma | D | 2,37E-01 | 9,67E-06 |
| AzCIB_1231 | catalasa/peroxidasa | P | 2,35E-01 | 4,41E-08 |
| AzCIB_2977 | hidrogenasa dependiente de Ni, subunidad beta | C | 2,32E-01 | 1,64E-09 |
| AzCIB_0067 | piruvato aminotransferasa | E | 2,32E-01 | 3,28E-13 |
| AzCIB_3604 | proteína putativa regulador transcripcional, familia AsnC | K | 2,31E-01 | 4,27E-07 |
| AzCIB_2980 | hidrogenasa dependiente de Ni, subunidad grande/ hidrógeno deshidrogenasa, subunidad beta | C | 2,29E-01 | 3,96E-10 |
| AzCIB_2978 | hidrogenasa dependiente de Ni, subunidad pequeña/ hidrógeno deshidrogenasa, subunidad delta | C | 2,22E-01 | 4,44E-04 |
| AzCIB_1217 | proteína represor de unión a trp | R | 2,16E-01 | 1,68E-02 |
| AzCIB_3773 | ApaG | P | 2,13E-01 | 1,32E-03 |
| AzCIB_2409 | regulador transcripcional, tipo NNR | T | 1,82E-01 | 4,21E-02 |
| AzCIB_2527 | flavoproteína-ubiquinona oxidorreductasa, transferencia de electrones (EtfD) | C | 1,82E-01 | 3,37E-03 |
| AzCIB_1188 | proteína de la familia de extrusión 1 hidrófobo/anfifilo | V | 1,67E-01 | 7,38E-03 |
| AzCIB_2708 | proteína hipotética AZKH_2189 | | 1,67E-01 | 2,24E-03 |
| AzCIB_3387 | proteína oxidorreductasa, betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) | C | 1,54E-01 | 3,36E-02 |
| AzCIB_3399 | citocromo c oxidasa, subunidad I | C | 1,54E-01 | 3,40E-03 |
| AzCIB_3607 | uroporfirinógeno-III metilasa sirohemo sintasa | H | 1,41E-01 | 8,56E-19 |
| AzCIB_1160 | patatina | R | 1,33E-01 | 6,90E-04 |
| AzCIB_2179 | simportador nitrato/protón | P | 1,32E-01 | 1,52E-40 |
| AzCIB_4289 | proteína hipotética AZKH_4353 | S | 1,18E-01 | 2,97E-02 |
| AzCIB_1022 | proteína hipotética AZKH_1516 | R, S | 1,05E-01 | 5,76E-18 |

Resultados

| | | | | |
|------------|--|---|----------|-----------|
| AzCIB_3177 | proteína hipotética AZKH_3288 | S | 1,00E-01 | 2,10E-02 |
| AzCIB_3601 | Nitrito reductasa | C | 9,52E-02 | 1,05E-05 |
| AzCIB_2180 | antiportador nitrato/nitrito | P | 9,36E-02 | 2,99E-169 |
| AzCIB_0030 | proteína hipotética HMPREF0380_01560 | | 9,09E-02 | 1,29E-02 |
| AzCIB_0931 | triptofanasa | E | 9,09E-02 | 2,58E-04 |
| AzCIB_1025 | proteína hipotética AZKH_1517 | T | 9,09E-02 | 2,48E-02 |
| AzCIB_3152 | regulador transcripcional, familia CysB | K | 8,70E-02 | 4,82E-02 |
| AzCIB_0017 | GcdH | I | 8,33E-02 | 2,89E-04 |
| AzCIB_3440 | complejo de membrana tipo formato hidrógenoliasa (HyfG) | C | 7,69E-02 | 1,36E-02 |
| AzCIB_3070 | regulador Sir2 (<i>silent information regulator</i>) | K | 7,41E-02 | 1,90E-03 |
| AzCIB_3337 | proteína oxidiorreductasa, glicolato oxidasa, subunidad de unión a FAD | C | 7,41E-02 | 1,25E-03 |
| AzCIB_2697 | diguanilato ciclasa/fosfodiesterasa con sensor PAS/PAC | T | 7,14E-02 | 7,39E-05 |
| AzCIB_2883 | proteína de resistencia a acriflavina A (TtgA) | M | 6,45E-02 | 1,56E-02 |
| AzCIB_4559 | proteína hipotética MW7_0821 | | 6,45E-02 | 5,81E-03 |
| AzCIB_4579 | proteína de unión a leucina (LBP), precursor | E | 6,45E-02 | 1,86E-02 |
| AzCIB_2102 | proteína de la familia de la fasina | | 5,88E-02 | 1,99E-03 |
| AzCIB_4072 | proteína hipotética AZKH_4036 | | 5,71E-02 | 2,02E-21 |
| AzCIB_4660 | proteína putativa de fago, cola | | 5,71E-02 | 2,06E-04 |
| AzCIB_3358 | proteína de biosíntesis de molibdopterina MoeY | | 5,13E-02 | 5,99E-04 |
| AzCIB_4669 | proteína hipotética conservada | | 4,55E-02 | 1,65E-02 |

*En aquellos genes en los que en alguna de las dos condiciones no se cumple que RPKM>0, se ha empleado para el cálculo de FC el método RPKM+1.

En la condición basal de piruvato, de los 41 genes que aparecen diferencialmente expresados entre las dos cepas de estudio, cabe destacar que la mayoría, el 85,4 % (35 genes) aparecen sobreexpresados en el mutante respecto a la cepa parental, y solo 6 genes, que representan el 14,6 %, aparecen reprimidos. Sin embargo, en la condición de choque con tolueno, 119 DEG, que representan el 65,4 %, aparecen reprimidos en el mutante respecto a la cepa parental y sólo 63 genes (34,6 %) están sobreexpresados en la cepa mutante respecto a la parental.

Para realizar un primer análisis acerca de las posibles funciones celulares afectadas por la mutación del gen *tolR*, se agruparon los DEG dentro de cada categoría de grupos ortólogos (*Clusters of orthologous groups*, COG) (Tatusov y cols., 1997) para cada una de las condiciones.

De los 41 DEG identificados en piruvato y de los 181 identificados tras choque de tolueno (sin tener en cuenta el tRNA de Gly), 27 y 145 han podido agruparse en 12 y 18 categorías COGs, respectivamente. (Fig. 49).

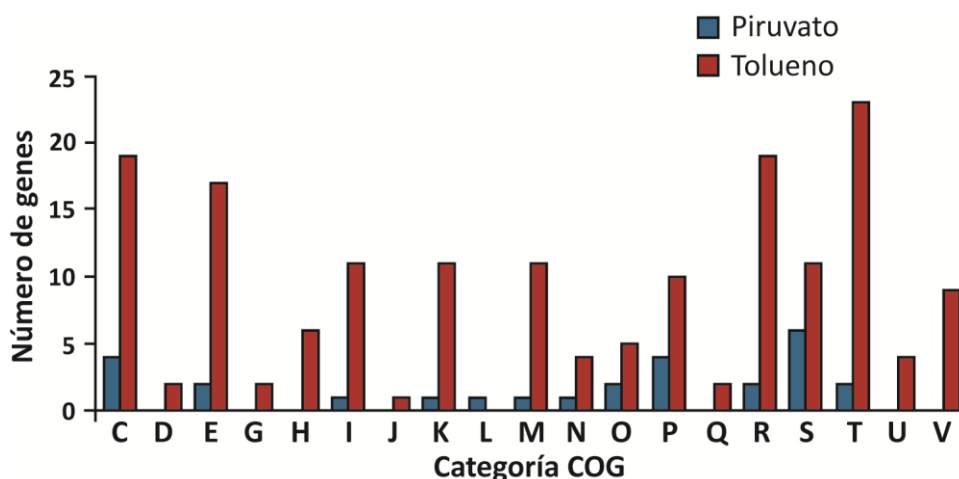


Figura 49. Distribución en categorías funcionales COG de los DEG cuando las cepas *Azoarcus* sp. CIB y *Azoarcus* sp. CIBdtolR se cultivan en piruvato (barras azules) o tras un choque con tolueno (barras rojas). Designación de categorías funcionales: C, producción y conversión de energía; D, control del ciclo celular y mitosis; E, metabolismo y transporte de aminoácidos; G, metabolismo y transporte de carbohidratos; H, metabolismo de coenzimas; I, metabolismo de lípidos; J, traducción; K, transcripción; L, replicación y reparación; M, biogénesis de la membrana y la pared celular; N, movilidad celular; O, modificaciones post-traduccionales, intercambio de proteínas y chaperonas; P, transporte y metabolismo de iones inorgánicos; Q, biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios; R, genes de función predictiva; S, genes de función desconocida; T, mecanismos de transducción de señales; U, tráfico intracelular y secreción; V, mecanismos de defensa.

En la condición de crecimiento en piruvato más de un 10% del total de DEG pertenecen a las categorías COG relacionadas con producción y conversión de energía (C) y con transporte y metabolismo de iones inorgánicos (P). Por otro lado, en la condición de choque con tolueno, más de un 10 % del total de DEG pertenecen a las categorías COG relacionadas con mecanismos de transducción de señales (T), producción y conversión de energía (C), y genes asociados a transporte y metabolismo de aminoácidos (E).

En el caso concreto de la condición de choque con tolueno parece claro que está alterada la red de señalización celular, ya que es de destacar el importante número de genes (23), que representan casi el 16 % de los DEG, agrupados en la categoría de mecanismos de transducción de señales (T). De estos 23 genes, 6 se clasifican además

en otras categorías COG, e.g., AzCIB_0069 que también pertenece a genes asociados a transporte y metabolismo de aminoácidos (E), AzCIB_0125, AzCIB_0020 y AzCIB_2287 incluidos en genes asociados a transcripción (K), AzCIB_1926 relacionado con movilidad (N), y AzCIB_2258 que también se asocia con control de ciclo celular o división (N y D).

Entre las proteínas de señalización celular diferencialmente expresadas, están presentes varias histidina quinasas (AzCIB_3721, AzCIB_2741, AzCIB_2352, AzCIB_0018) o una posible serín proteín quinasa (AzCIB_2893), reguladores de respuesta de varios tipos, con dominios de unión a AMPc (AzCIB_1250 y AzCIB_1972), proteínas relacionadas con el di-GMPc que contienen dominios EAL y GGDEF (AzCIB_4247 y AzCIB_0767), algunos de éstos además asociados a membrana (AzCIB_1025, AzCIB_2697), proteínas con dominios implicados en el reconocimiento de señales tales como GAF (AzCIB_0020) o un posible regulador transcripcional con dominio PAS (AzCIB_2287), así como proteínas que participan en quimiotaxis del tipo Che-Y (AzCIB_0692, AzCIB_0125, AzCIB_0575) o MCP (*Methyl-accepting chemotaxis protein*) (AzCIB_1926, AzCIB_2258).

Además, tras el choque de tolueno, podemos apreciar un conjunto de genes diferencialmente expresados relacionados con la membrana y pared celular (M), entre ellos varios tipos de transferasas (AzCIB_2664, AzCIB_0495, AzCIB_0078, AzCIB_1835, AzCIB_1415), proteínas de membrana interna (AzCIB_2883, AzCIB_1721, AzCIB_1725) o externa (AzCIB_1723, AzCIB_0322, AzCIB_1916). Otro grupo mayoritario de DEG, son aquellos incluídos dentro de la categoría de mecanismos de defensa (V), como por ejemplo, AzCIB_3914, AzCIB_4433, AzCIB_3849, AzCIB_4434, AzCIB_1085, AzCIB_0546, AzCIB_1188, AzCIB_4432 y AzCIB_4437, y que básicamente codifican presuntas bombas de extrusión y transportadores tipo ABC.

En resumen, tanto en condiciones de crecimiento anaeróbico en piruvato como tras el choque de tolueno, la mutación en el gen *tolR* parece que genera cambios significativos en funciones relacionadas con la producción y conversión de energía. Por otro lado, tras el choque de tolueno la inactivación del gen *tolR* afecta fundamentalmente a la red de señalización celular, envueltas celulares y mecanismos de resistencia, lo que está de acuerdo con la reducida viabilidad celular de la cepa *Azoarcus* sp. CIB*dtolR* cuando se enfrenta a una elevada concentración de tolueno.

VI. ANEXO I

Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos del gen *tolR* de *Azoarcus* sp. CIB. Las flechas indican la posición de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo, se señalan en rojo los residuos clave de los distintos dominios y en gris los dominios de la proteína TolR.

VII. DISCUSIÓN

Los hidrocarburos aromáticos tales como el tolueno y otros compuestos BTEX, e.g., xilenos, representan una importante fuente de carbono y energía para los microorganismos que son capaces de degradarlos. Así, por un lado, los compuestos aromáticos disparan la respuesta metabólica que implica su mineralización y utilización como fuente de carbono y energía. Por otro lado, las bacterias inducen una importante respuesta de estrés como consecuencia del efecto tóxico de estas moléculas sobre la integridad de la envoltura celular. Ambos tipos de respuestas suponen importantes cambios en los programas metabólico, morfológico y de estrés en la bacteria, que están controlados por una compleja red de circuitos reguladores (Ramos y cols., 2002; Shingler, 2003; Díaz y cols., 2013).

En los últimos años se han producido avances significativos en la identificación y caracterización de los determinantes bioquímicos y genéticos responsables de la degradación anaeróbica de los compuestos aromáticos (Carmona y cols., 2009; Fuchs y cols., 2011; Boll y cols., 2014; Rabus y cols., 2014). Además, estudios proteómicos realizados con la β -proteobacteria *Aromatoleum aromaticum* EbN1 han permitido descifrar algunos de los mecanismos implicados en la respuesta de estrés inducida en la bacteria por los hidrocarburos aromáticos en condiciones anóxicas (Trautwein y cols., 2008; Zink y cols., 2010), si bien los mecanismos de regulación que controlan el disparo de la respuesta de estrés no son conocidos hasta la fecha en ningún organismo anaerobio.

La β -proteobacteria *Azoarcus* sp. CIB ha sido ampliamente estudiada en nuestro laboratorio por su capacidad para degradar tanto aeróbica como anaeróbicamente un buen número de compuestos aromáticos entre los que se incluyen hidrocarburos BTEX como el tolueno y *m*-xileno (Blázquez, 2009; Carmona y cols., 2009; Juárez y cols., 2013). El cluster *bss-bbs* de *Azoarcus* sp. CIB codifica la ruta periférica que convierte el tolueno y *m*-xileno en los intermediarios centrales benzoil-CoA y 3-metil-benzoil-CoA, respectivamente (Blázquez, 2009; Juárez y cols., 2013). Al igual que ocurre en organismos filogenéticamente próximos, e.g., cepas del género *Thauera* y *Azoarcus*, en posición 5' del cluster *bss-bbs* se localizan los genes reguladores *tdiSR*. Sin embargo, el cluster *bss-bbs* de *Azoarcus* sp. CIB contiene un gen, *tolR* (Fig. 5), que no se ha descrito hasta la fecha en ningún cluster de degradación de compuestos aromáticos, y cuyo producto génico, la proteína TolR, es consistente con un nuevo Sistema Regulador de

Dos Componentes Híbrido (*Hybrid Two-Component System*, HTCS) (Blázquez, 2009). Dado que la inactivación del gen *tolR* no causa ningún defecto significativo en el crecimiento anaeróbico de la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB*dtolR* utilizando tolueno como única fuente de carbono y energía (Blázquez, 2009), parecía plausible apostar por su participación en otro tipo de respuestas de adaptación a los hidrocarburos aromáticos, e.g., quimiotaxis y/o resistencia a concentraciones tóxicas de hidrocarburos.

1. El gen *tolR* está implicado en la adaptación anaeróbica de *Azoarcus* sp. CIB a los hidrocarburos aromáticos

Los estudios de quimiotaxis realizados en esta Tesis Doctoral, tanto a tiempos cortos (independientes de crecimiento bacteriano) como a tiempos largos (dependientes de crecimiento bacteriano) confirman resultados preliminares (Blázquez, 2009) y demuestran que el gen *tolR* está directamente implicado en la respuesta quimiotáctica positiva de *Azoarcus* sp. CIB a los hidrocarburos aromáticos ya que ésta se inhibe en la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB*dtolR* y se recupera en la cepa *Azoarcus* sp. CIB*dtolR* (pIZ*TolR*) complementada con el gen *tolR* parental (Figs. 12, 13 y 16). La quimiotaxis dependiente del gen *tolR* es específica para los hidrocarburos aromáticos ya que no se ve impedida en la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB*dtolR* cuando ésta se enfrenta a ácidos orgánicos tanto aromáticos, e.g. benzoato, como no aromáticos, e.g. piruvato (Fig. 14). Además, dicha respuesta quimiotáctica a los hidrocarburos es estrictamente dependiente de anaerobiosis, ya que no tiene lugar en condiciones aeróbicas (Fig. 11), y sólo ocurre en los primeros momentos de la adaptación bacteriana a la presencia del hidrocarburo (Fig. 9).

La quimiotaxis positiva de *Azoarcus* sp. CIB hacia hidrocarburos aromáticos que son fuente de carbono y energía en anaerobiosis, e.g., tolueno y *m*-xileno, supone una ventaja adaptativa para la bacteria al facilitarle la búsqueda de nutrientes. Sin embargo, la respuesta quimiotáctica dependiente de TolR también tiene lugar en presencia de hidrocarburos aromáticos que no pueden ser degradados anaeróbicamente, e.g., etilbenceno (Fig. 15), lo que revela que se trata de una quimiotaxis que no requiere el metabolismo del compuesto que actúa como atrayente. La quimiotaxis a compuestos aromáticos que no son fuente de carbono para la

bacteria se puede interpretar como una ventaja adaptativa que facilita la adquisición por transferencia génica horizontal a partir de bacterias degradadoras presentes en los lugares contaminados, de los determinantes genéticos necesarios para la degradación de dichos compuestos aromáticos.

Por otro lado, los resultados presentados en esta Tesis demuestran que la presencia de la proteína TolR en la cepa parental *Azoarcus* sp. CIB le confiere una mayor capacidad de resistencia a concentraciones tóxicas del hidrocarburo aromático (tolueno). Así, mientras que la viabilidad de la cepa CIB tras 2 h de incubación anaeróbica con tolueno 20 mM (una concentración 10 veces superior a la máxima concentración a la que se observa crecimiento anaeróbico con tolueno como única fuente de carbono), no se ve significativamente comprometida, la viabilidad de la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB*ΔtolR* se reduce al menos un orden y medio de magnitud en presencia de tolueno 20 mM. La resistencia al efecto tóxico del tolueno se restaura cuando se expresa el gen *tolR* en la cepa complementada *Azoarcus* sp. CIB*ΔtolR* (pIZ*TolR*) (Fig. 17), confirmando que el mecanismo de resistencia está controlado y/o es dependiente del gen *tolR*. Al igual que se había observado anteriormente para la respuesta quimiotáctica, la resistencia al efecto tóxico del tolueno dependiente de TolR sólo se observa en condiciones anaeróbicas, y no requiere el metabolismo del hidrocarburo (Fig. 17).

Los resultados comentados anteriormente permiten concluir que el gen *tolR* está controlando distintos procesos auxiliares, e.g., quimiotaxis, resistencia a toxicidad, implicados en la adaptación anaeróbica de *Azoarcus* sp. CIB a los hidrocarburos aromáticos, lo que está de acuerdo con su localización dentro del cluster *bss-bbs* que codifica la ruta periférica de degradación de hidrocarburos aromáticos en esta bacteria. El hecho de que el gen *tolR* represente el primer ejemplo de elemento regulador que controla la respuesta de estrés en bacterias que degradan anaeróbicamente hidrocarburos aromáticos nos impulsó a estudiar en detalle el mecanismo de acción de su producto génico, la proteína TolR.

2. Caracterización molecular del sistema regulador de dos componentes híbrido TolR de *Azoarcus* sp. CIB

La peculiar arquitectura modular de la proteína TolR (1049 aa) es consistente con

un HTCS cuyo supradominio N-terminal contiene una presunta histidina quinasa (HK) sensora de hidrocarburos aromáticos y el supradominio C-terminal es un posible regulador de respuesta (RR) con actividad enzimática sobre el segundo mensajero di-GMPc (Fig. 5). Como se ha indicado en la Introducción (apartado 3), los escasos ejemplos de HTCSs caracterizados hasta la fecha son los pertenecientes al grupo de los Bacteroides y funcionan como reguladores transcripcionales implicados en la regulación del metabolismo de carbohidratos en estas bacterias del tracto digestivo (Sonnenburg y cols., 2006; Lowe y cols., 2012; Lynch y Sonnenburg, 2012; Ravcheev y cols., 2013). En este sentido, TolR representaría el primer HTCS que no responde a carbohidratos sino a hidrocarburos aromáticos y cuyo elemento regulador de respuesta no es un motivo de unión a DNA sino un dominio con actividad enzimática. Además, dado que la proteína TolR carece de un dominio típico transmembrana la posible localización citoplasmática del dominio sensor de TolR (predicción mediante los servidores PSLPred y PSORTb) permite predecir que se trata de una proteína receptora de señales intracelulares. Este hecho también es único en la familia de sistemas reguladores HTCS, pues, como ya se indicó en la Introducción, todos los ejemplos descritos hasta la fecha contienen un dominio de anclaje a membrana, con un dominio sensor expuesto al exterior y recibiendo señales extracelulares (Sonnenburg y cols., 2006; Lowe y cols., 2012).

En la región N-terminal de la proteína TolR se localizan los dominios PAS y AK, con identidad de secuencia significativa con los dominios ortólogos presentes en las histidín-quinasas híbridas TutC, TodS, TmoS y StyS que controlan la expresión de los genes *tut*, *tod*, *tmo* y *sty*, respectivamente, implicados en el catabolismo aeróbico de tolueno (*tut*, *tod*) y estireno (*sty*) en distintas cepas de los géneros *Pseudomonas* y *Thauera* (Yen y cols., 1991; Mosqueda y cols., 1999; Tropel y van der Meer, 2004; Carmona y cols., 2008).

El dominio AK posee un motivo DHp, en el cual se encuentra el residuo His¹⁹⁰ conservado y presuntamente implicado en la autofosforilación de la proteína. El motivo DHp está conectado al motivo catalítico (CA) que cataliza la unión e hidrólisis del ATP a través de las cajas N, G1, F y G2 (aminoácidos 304-405 de TolR) responsables de la autofosforilación del dímero histidina quinasa (Stewart, 2010). Según la clasificación de Grebe y Stock, la proteína TolR pertenece a la subfamilia HPK1a (Grebe

y Stock, 1999). Como se ha demostrado en esta tesis mediante ensayos *in vitro* con ATP marcado radiativamente, la proteína TolR es capaz de autofosforilarse de forma basal, y esta fosforilación aumenta 5 veces en presencia de tolueno (Fig. 19). Como cabría esperar, la sustitución del residuo His¹⁹⁰ por un residuo de Val genera una proteína, TolR^{H190V}, que no es capaz de autofosforilarse (Fig. 20). En los ensayos realizados, la autofosforilación de TolR alcanza un máximo a los 15 min y disminuye gradualmente a tiempos de incubación más largos (Fig. 19), lo que está de acuerdo con un proceso de autofosforilación que no es permanente sino que va seguido de la defosforilación de la proteína TolR-P y liberación del Pi, lo que finalmente se traduce en el consumo del ATP utilizado en la reacción de autofosforilación (Fig. 36) y, por ende, en la disminución de la cantidad de proteína fosforilada a tiempos de incubación largos.

Cuando se expresó el supradominio quinasa sensor solo en ausencia del supradominio efector en la proteína recombinante TolR_{SK}, se confirmó la actividad autoquinasa de éste. Curiosamente, la actividad autoquinasa de TolR_{SK} era significativamente mayor que la de la proteína TolR nativa, siendo su nivel de activación por tolueno (2,5 veces de inducción) significativamente menor que en TolR (Fig. 33). Estos resultados sugieren, por tanto, que el supradominio efector de TolR está modulando la actividad autoquinasa basal del supradominio quinasa sensor, lo que podría contribuir a paliar un excesivo consumo de ATP celular.

El dominio REC de la proteína TolR posee identidad de secuencia significativa con el dominio REC presente en las HK híbridas TodS, TutC, TmoS y StyS, y posee los residuos conservados que caracterizan a este tipo de dominios y que incluyen, entre otros, al residuo Asp⁴⁹⁹ (en TolR) que previsiblemente se fosforila utilizando como donador el fosfato del dominio HK fosforilado (Gao y Stock, 2009). La transferencia intramolecular del grupo fosfato desde el dominio autoquinasa al dominio receiver de TolR se ha confirmado experimentalmente en esta tesis, demostrándose un claro efecto activador del tolueno en la reacción de autofosforilación del dominio AK (Fig. 23). La transferencia intramolecular del grupo fosfato del dominio AK al dominio REC ha sido recientemente demostrada para el HTCS BT3172 de *B. thetaiotamicron* (Townsend y cols., 2013). En este trabajo, los autores demostraron también que al separar los dos supradominios del HTCS ocurría la transfosforilación *in vitro* del componente quinasa

sensor al componente regulador de respuesta (Townsend y cols., 2013). De forma similar, en esta tesis hemos demostrado que el supradominio quinasa sensor (ToIR_{SK}) es capaz de transfosforilar al supradominio regulador de respuesta (ToIR_{RR}) que contiene los dominios REC, DGC y EAL (Fig. 34). Además, es interesante destacar que el tolueno no parece ejercer ningún efecto activador significativo sobre la reacción de transfosforilación (Fig. 35), al igual que se observó en la reacción de transferencia intramolecular del fosfato con la proteína nativa ToIR (Fig. 23), lo que permite sugerir que la activación mediada por tolueno tiene lugar principalmente a nivel de la actividad autoquinasa. El hecho de que apenas se acumule proteína ToIR-P o ToIR_{RR}-P en los ensayos *in vitro* de transferencia de fosfato (Figs. 23 y 34), a pesar de que existe consumo del ATP utilizado como sustrato (Fig. 36), sugiere que la reacción de defosforilación del dominio REC fosforilado por parte del dominio AK es significativamente más rápida que la reacción de transferencia del fosfato del dominio AK al dominio REC, lo que finalmente se traduce en la conversión estequiométrica del ATP marcado en Pi radiactivo liberado al ensayo (Fig. 36). Dado que la eficiencia de autofosforilación de ToIR_{SK} parece ser incluso superior a la de ToIR (Fig. 33), el significativo mayor consumo de ATP por parte de ToIR que por parte del CTCS ToIR_{SK-RR} (Fig. 36), sugiere que la transferencia intramolecular del fosfato del dominio AK al dominio REC en ToIR es más eficiente que la transferencia intermolecular del fosfato del componente quinasa sensor ToIR_{SK} al dominio REC del componente regulador de respuesta ToIR_{RR}. Estos resultados son de gran relevancia ya que revelan por primera vez la mayor eficiencia en la cascada de fosforilación *in vitro* de un HTCS frente a un CTCS.

Respecto a la región efectora de ToIR, está constituida por dos dominios enzimáticos, DGC y PDE, presuntamente implicados en la síntesis y degradación, respectivamente, del segundo mensajero celular di-GMPc. Un análisis detallado del dominio DGC de la proteína ToIR reveló que la secuencia consenso del centro activo, sitio A (GG(D/E)F), y del motivo de inhibición, sitio I (RxxD) (Schirmer y Jenal, 2009), se encuentran modificadas (697-GDREF-701 y 688-HxxD-691) (Fig. 5). Dominios DGC degenerados similares en los que el residuo Asp catalítico ha sido sustituido ya se han descrito en la literatura, y todos ellos carecen de actividad DGC, si bien generalmente son capaces de unir GTP contribuyendo a la regulación alostérica del dominio PDE

adyacente (Christen y cols., 2005; Kazmierczak y cols., 2006). La posible función del dominio DGC degenerado de TolR como regulador alostérico del dominio PDE necesita confirmación experimental futura.

Por otro lado, el análisis de la secuencia del dominio PDE de la proteína TolR revela la conservación de todos los residuos clave en la interacción e hidrólisis del di-GMPc, el motivo 823-EAL-825 (Schmidt y cols., 2005), así como de otros aminoácidos (Asn⁸⁸¹, Glu⁹¹¹, Asp⁹⁴³, Lys⁹⁶⁴ y Glu¹⁰⁰⁰) implicados en la coordinación con metales (Schirmer y Jenal, 2009), lo que sugiere que TolR posee actividad PDE de di-GMPc. Ensayos enzimáticos realizados con extractos de *E. coli* conteniendo el plásmido pIZTolR y el compuesto bis-*p*-nitrofenilfosfato, que ha sido empleado para detectar la actividad fosfodiesterasa de di-GMPc en otras proteínas con motivos EAL (Bobrov, 2005), sugerían la presencia de dicha actividad en la proteína TolR (Fig. 26). Esta actividad se confirmó *in vivo* utilizando la cepa *E. coli* TRMG, que posee niveles elevados de di-GMPc y por ello una capacidad de formación de biopelículas incrementada, y *P. aeruginosa* PAO1pel, una cepa en la que los niveles elevados de di-GMPc permiten la expresión de la fusión *PpelA::lacZ*, observándose una reducción en la formación de biopelículas y en la actividad β-galactosidasa, respectivamente, cuando las cepas se complementan con el gen *tolR* clonado en pIZTolR (Figs. 25 y 28), de forma similar a como lo hace la PDE control PA2133 (Hickman y cols., 2005). Además, la complementación de *P. aeruginosa* PAO1pel con el gen *tolR* mostró el efecto inductor del tolueno sobre la actividad PDE basal de TolR que se incrementó unas 5 veces (Fig. 28). En los dos casos, la actividad PDE de TolR sólo se observó cuando las células se cultivaron en anaerobiosis pero no cuando se crecían en condiciones aeróbicas (Fig. 28), lo que está de acuerdo con el hecho de que los fenotipos asociados a la inactivación del gen *tolR* (quimiotaxis y resistencia a hidrocarburos aromáticos disminuidas) sólo sean evidentes cuando *Azoarcus* sp. CIB se cultiva en condiciones anaeróbicas (Figs. 11, 12 y 17). Por otro lado, la sustitución del residuo His¹⁹⁰ por un residuo de Val en la proteína TolR genera una proteína (TolR^{H190V}) que no presenta actividad fosfodiesterasa de di-GMPc (Figs. 25 y 28), confirmando que la actividad del supradominio regulador de respuesta es dependiente de la autofosforilación del supradominio HK sensor.

Para estudiar el rango de efectores de la proteína TolR se analizó la capacidad de distintos compuestos aromáticos y no aromáticos para inducir la autofosforilación de la proteína *in vitro* (Fig. 21) y su actividad enzimática PDE de di-GMPc *in vivo* (Fig. 29). Diferentes compuestos aromáticos con una o dos sustituciones en el anillo eran inductores de TolR, pero compuestos con sustituciones carboxílicas (benzoato), con grupos alquilo ramificados (cumeno) o compuestos con tres o más sustituciones en el anillo aromático (hidroxiquinol), no eran capaces de inducir la autofosforilación de TolR. Estos resultados sugieren que el bolsillo de reconocimiento e interacción con la molécula inductora en TolR es relativamente pequeño e hidrofóbico. Curiosamente, compuestos no aromáticos, como el hexano y el ciclohexano, también eran inductores de TolR (Figs. 21 y 29), lo cual podría responder al hecho de que el ciclohexano es un compuesto cíclico, igual que el benceno, y el hexano, podría adquirir también una conformación similar en el bolsillo de reconocimiento del efector de TolR.

El dominio PAS-1 de la HK híbrida TodS es el responsable de la interacción con el tolueno y sus análogos, tales como benceno, xileno y estireno, siendo los residuos Phe⁴⁶, Ile⁷⁴, Phe⁷⁹, y Ile¹¹⁴ los encargados de dicha interacción según se deduce del modelo de estructura propuesto para dicho dominio. Mediante experimentos de mutagénesis dirigida se ha determinado que el residuo Phe⁷⁹ es el principal implicado en la interacción con el ligando, ya que su sustitución aumenta la K_D para el tolueno más de 200 veces, mientras que la sustitución de los otros tres residuos aumenta la K_D tan sólo de 2 a 5 veces (Busch y cols., 2007). En esta tesis se ha demostrado que la sustitución del residuo Phe⁷⁹ por un residuo de Ala genera una proteína TolR^{F79A} mutante incapaz de incrementar su actividad PDE de di-GMPc (Fig. 31) en presencia de distintos compuestos inductores, lo que confirma experimentalmente que el residuo Phe⁷⁹ localizado en el dominio PAS de TolR está implicado en la interacción con las moléculas efectoras. La construcción de un modelo tridimensional del dominio PAS de TolR y experimentos de *docking* (Fig. 22) permiten sugerir que dicho dominio PAS posee un único bolsillo de reconocimiento de efectores capaz de acomodar una gran variedad de compuestos aromáticos diferentes, como ocurre con el dominio PAS-1 de TodS (Busch y cols., 2007).

Poco se sabe sobre la aparición y las ventajas de los HTCSs frente a CTCSSs, dados los escasos ejemplos estudiados hasta la fecha. La hipótesis más extendida sobre la

aparición de los HTCSs postula fusiones génicas de un supradominio sensor N-terminal y otro regulador de respuesta C-terminal seguidas de duplicaciones a lo largo de la evolución de los CTCs (Whitworth y Cock, 2009). La compleja organización molecular de la proteína TolR sugiere que se ha originado en el curso de la evolución fusionándose el supradominio sensor y el dominio REC de las histidín-quinazas híbridas que regulan la expresión de los genes implicados en el catabolismo de hidrocarburos aromáticos, con un dominio efector implicado en el metabolismo del di-GMP. Por otro lado, la evolución de CTCs a partir de HTCSs es otra hipótesis de trabajo que debería ser validada. En esta tesis, los estudios realizados en *P. aeruginosa* PAO1pel y en *Azoarcus* sp. CIBdtolR conteniendo TolR_{SK-RR} revelaron que este CTC artificial era funcional y respondía a la presencia de tolueno induciendo una bajada en los niveles de di-GMP en la célula que se traducían en una menor actividad β -galactosidasa y una mayor resistencia al choque de tolueno, respectivamente (Fig. 38). Confirmando la mayor actividad autoquinasa basal de TolR_{SK} observada *in vitro* (Fig. 33), también se observó una mayor actividad PDE basal en TolR_{RR} que en la proteína nativa TolR, lo que se tradujo en una menor actividad β -galactosidasa en ausencia de tolueno en el sistema TolR_{SK-RR} que en el sistema HTCS TolR (Fig. 38). Dado que el componente TolR_{RR} por separado no era capaz de inducir ningún cambio en los fenotipos analizados (Fig. 38), se concluyó que la actividad PDE de di-GMP requiere una activación mediada por la fosforilación del dominio REC por parte del componente TolR_{SK}, un resultado que está de acuerdo con el hecho de que el mutante TolR^{H190V} tampoco muestre actividad PDE de di-GMP *in vivo* (Figs. 25 y 28). Estos resultados constituyen la primera demostración de que un HTCS se puede evolucionar *in vitro* a un CTC funcional cuando los dos componentes fusionados se separan artificialmente, sugiriendo que nuevos CTCs podrían evolucionar en la naturaleza a partir de los HTCS presentes actualmente en algunas bacterias.

Si bien una de las potenciales ventajas evolutivas de los HTCSs sobre los CTCs podría ser que, al estar unidos los componentes HK y RR en la misma molécula el proceso de transferencia de fosfato fuera más rápido, eficaz y específico porque se facilita la formación del complejo HK:RR y se aumenta su concentración local relativa (Cock y Whitworth, 2007; Whitworth y Cock, 2009; Raghavan y Groisman, 2010; Townsend y cols., 2013), hasta ahora nadie ha aportado evidencias experimentales

que avalen esta hipótesis. Como se ha comentado anteriormente, los ensayos *in vitro* revelaron que la transferencia intramolecular de fosfato en la proteína TolR era más eficaz que la transferencia intermolecular en el CTCS TolR_{SK-RR}. Para demostrar si esta mayor eficiencia *in vitro* se traducía en una mayor eficacia del HTCS sobre el CTCS *in vivo*, se comparó su actividad PDE de di-GMPc en la célula. Los resultados obtenidos en *P. aeruginosa* PAO1 Δ wspF expresando el sistema nativo TolR o el sistema artificial TolR_{SK-RR} revelaron claramente que el sistema HTCS era más rápido y eficaz que el CTCS para modular los niveles de di-GMPc en la célula en presencia de la molécula inductora tolueno (Fig. 39). Por lo tanto, esta tesis constituye el primer ejemplo en el que se ha demostrado, tanto *in vitro* como *in vivo*, la hipótesis sobre las ventajas de eficiencia y rapidez que se presuponen a los sistemas HTCS sobre los CTCS.

3. Identificación de genes implicados en la cascada de señalización controlada por TolR

En conjunto los resultados presentados anteriormente permiten concluir que la proteína TolR es un nuevo sistema de transducción de señales en anaerobiosis que responde a la presencia de hidrocarburos aromáticos causando la hidrólisis de di-GMPc el cual, a su vez, controla ciertos mecanismos de adaptación de *Azoarcus* sp. CIB a la presencia de estos compuestos. Dos de estos mecanismos, quimiotaxis a hidrocarburos aromáticos y resistencia a concentraciones tóxicas de estos compuestos, han sido identificados en esta tesis (ver más arriba).

Es bien conocido que la inactivación de proteínas con actividad PDE o la hiperexpresión de proteínas con actividad DGC produce un aumento en los niveles de di-GMPc (Tamayo y cols., 2007; Römling y cols., 2013), lo que se traduce en un significativo cambio en el estilo de vida de las bacterias que pasan de ser móviles a sésiles (Römling y cols., 2005, 2006, 2013; Hengge, 2009; Kuchma y cols., 2014). La disminución de movilidad tiene lugar a través de la regulación de la función y/o biosíntesis de flagelos o pilis, como ocurre con el regulador FleQ de *P.aeruginosa* que responde a niveles de di-GMPc (Jyot y cols., 2002; Kazmierczak y cols., 2006; Girgis y cols., 2007; Kim y McCarter, 2007; Srivastava y cols., 2013), o a través de alteraciones en la maquinaria quimiotáctica afectando a receptores con dominios PilZ, como PlzA de *Borrelia burgdorferi* (Sultan y cols., 2011) o Tlp1 de *Azospirillum brasilense* (Russell y

cols., 2013) o factores de transcripción como XbmR de *Xanthomonas citri* (Yaryura y cols., 2014). Analizando los datos de transcriptómica presentados en esta tesis (Tablas 5 y 6) se observa que tras la exposición a tolueno, la expresión de genes ortólogos a genes implicados en la maquinaria flagelar, como por ejemplo la proteína FlIT (AzCIB_0976), y quimiotáctica, como por ejemplo una proteína de quimiotaxis metilo-aceptora (AzCIB_1926), la proteína MCP metiltransferasa/metilesterasa CheR/CheB (AzCIB_2258), así como proteínas del tipo CheY (AzCIB_0575, AzCIB_0692, AzCIB_0125) (Grebe y Stock, 1998; Bourret, 2002; Baker y cols., 2006; Hazelbauer y cols., 2008; Lacal y cols., 2011; Sourjik y Wingreen, 2012), está reprimida en la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIBdtolR con respecto a la observada en la cepa parental *Azoarcus* sp. CIB (Fig. 50), siendo consistente con la disminuida quimiotaxis a los hidrocarburos aromáticos observada en la cepa *Azoarcus* sp. CIBdtolR (Figs. 12 y 15).

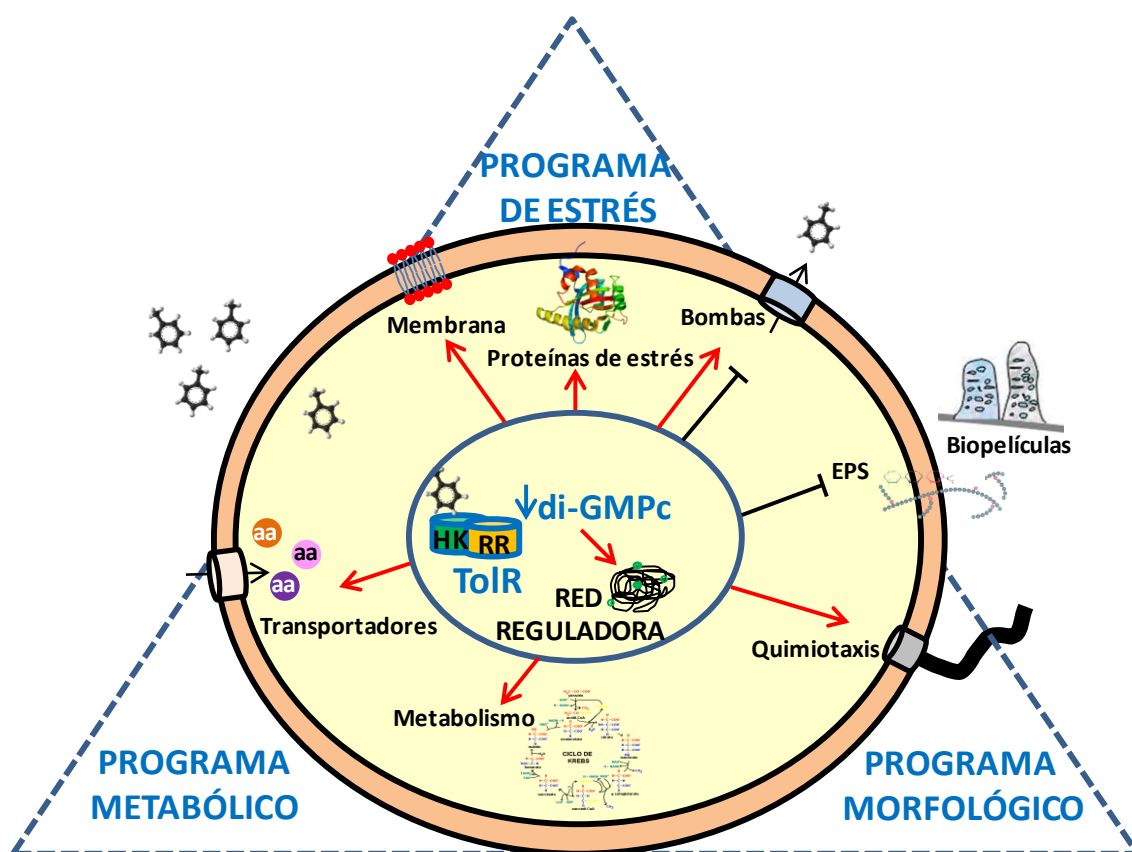


Figura 50. Esquema integrador que representa las funciones más relevantes inducidas (flecha roja) o reprimidas (flecha negra) en *Azoarcus* sp. CIB tras un choque de tolueno.

Si bien se ha descrito que existe un cambio en la expresión de genes que codifican proteínas con motivos DGC-EAL cuando *P. putida* se cultiva en presencia de compuestos aromáticos (Domínguez-Cuevas y cols., 2006), los resultados aportados en

esta tesis demuestran por primera vez la implicación directa de una actividad PDE de di-GMPc en la adaptación anaeróbica a concentraciones tóxicas de hidrocarburos aromáticos. La confirmación experimental de que los niveles de di-GMPc condicionan la resistencia al efecto tóxico de los hidrocarburos aromáticos en anaerobiosis se obtuvo con la clonación y expresión en *Azoarcus* sp. CIB*dtolR* del gen PA2133 de *P. aeruginosa* que codifica una PDE de di-GMPc (Hickman y cols., 2005). La cepa resultante que expresa la PDE heteróloga fue capaz de revertir el efecto tóxico de un choque de tolueno en *Azoarcus* sp. CIB*dtolR* (Fig. 40), al igual que se había observado previamente tras la complementación con el gen *tolR* endógeno (Fig. 17).

El análisis transcriptómico comparativo entre la cepa parental *Azoarcus* sp. CIB y la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB*dtolR* sometidas a un choque de tolueno reveló algunas de las bases moleculares controladas, directa o indirectamente, por los niveles de di-GMPc en la célula y que muy probablemente están mediando la resistencia de la bacteria al efecto tóxico de los hidrocarburos aromáticos. Así, cabe destacar que la implicación del gen *tolR* en la adaptación anaeróbica de la cepa CIB a los hidrocarburos aromáticos probablemente suponga el control de genes responsables de cambios en las envueltas celulares. En concreto, se observan alteraciones significativas de genes presuntamente implicados en: i) la síntesis de lípidos de membrana, e.g., enzimas inducidas (AzCIB_0495, AzCIB_1835) o reprimidas (AzCIB_1415, AzCIB_2664) en la cepa mutante respecto a la parental; ii) proteínas de membrana externa inducidas en la cepa mutante (AzCIB_0322, AzCIB_1916); iii) presuntos transportadores ABC y sistemas de extrusión inducidos en la cepa mutante (AzCIB_0546, AzCIB_1083, AzCIB_1085, AzCIB_1721, AzCIB_1723, AzCIB_1725; AzCIB_4432, AzCIB_4433, AzCIB_4434, AzCIB_4437); iv) presuntas bombas de expulsión de solventes reprimidas en la cepa mutante (AzCIB_1188, AzCIB_2883, AzCIB_3849, AzCIB_3914). Dado que cambios en la expresión de genes similares a los identificados más arriba se han descrito previamente en bacterias aeróbicas, e.g., diversas cepas de *Pseudomonas* (Pinkart y cols., 1996; Weber y de Bont, 1996; Junker y cols., 2001; Ramos y cols., 2002; Segura y cols., 2005; Matilla y cols., 2007, 2011; Torres y cols., 2011) y en la cepa *Burkholderia cepacia* (Ferreira y cols., 2013) y anaeróbicas, e.g. *Aromatoleum aromaticum* EbN1 (Trautwein y cols., 2008; Zink y Rabus, 2010), cuando se cultivan en presencia de compuestos aromáticos, los resultados presentados en este trabajo

sugieren que el gen *tolR* está controlando en gran medida la remodelación del programa morfológico cuando *Azoarcus* sp. CIB se enfrenta a concentraciones tóxicas de hidrocarburos aromáticos (Fig. 50).

Por otro lado, los estudios de transcriptómica revelan que en la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB*dtolR* muchos de los genes presuntamente implicados en la síntesis de aminoácidos, e.g., cisteína (AzCIB_3152, AzCIB_3153), leucina (AzCIB_4579), triptófano (AzCIB_0931) o glutamato (AzCIB_0069, AzCIB_0418), el metabolismo del carbono (AzCIB_0409, AzCIB_2952, AzCIB_3049, AzCIB_3354, AzCIB_3425, AzCIB_4080), así como genes relacionados con el metabolismo energético (AzCIB_0062, AzCIB_0234, AzCIB_0277, AzCIB_2410, AzCIB_2527, AzCIB_2664, AzCIB_2887, AzCIB_2977, AzCIB_2978, AzCIB_2980, AzCIB_3335, AzCIB_3337, AzCIB_3387, AzCIB_3399, AzCIB_3440, AzCIB_3554, AzCIB_3601, AzCIB_4074), tienen una expresión claramente inferior a la que muestran en la cepa parental tras el choque de tolueno (Tabla 6).

En conjunto, los resultados presentados en esta tesis revelan la implicación del gen *tolR*, y por tanto del di-GMPc, en el control de los programas morfológico y metabólico de la bacteria para la adaptación a concentraciones tóxicas de hidrocarburos aromáticos en condiciones anaeróbicas (Fig. 50) y están de acuerdo con la pérdida de viabilidad de la cepa mutante *tolR* cuando se somete al choque de tolueno (Fig. 17).

Dado que la proteína TolR muestra una actividad autoquinasa y PDE de di-GMPc basal independiente de la presencia de hidrocarburos aromáticos (Figs. 19, 23, 25 y 28), parecía lógico pensar que TolR pudiese también mediar el control anaeróbico de ciertos procesos celulares dependientes de los niveles de este segundo mensajero, e.g., agregación celular, formación de biopelículas, etc. (Römling y cols., 2005, 2006, 2013; Hengge, 2009), independientemente de la presencia de hidrocarburos aromáticos en el medio de cultivo.

La formación de biopelículas está ligada a la síntesis de exopolisacáridos (EPS), y se ha observado que, por ejemplo, en *P. aeruginosa* mutaciones en la PDE WspF inducen la expresión a través del regulador FleQ, de los genes *psl* y *pel* de síntesis de EPS (Hickman y cols., 2005), o en *Vibrio cholerae*, la expresión de los genes que codifican la síntesis del EPS disminuyen drásticamente cuando la PDE VieA es sobreexpresada (Tischler y Camilli, 2004). Cuando se realizó el análisis de los genes diferencialmente expresados en la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB*dtolR*, cultivada en piruvato en

ausencia de hidrocarburos aromáticos, respecto a la cepa control *Azoarcus* sp. CIB, se observó un aumento en la expresión de genes presuntamente implicados en la síntesis de EPS (AzCIB_0496; AzCIB_1836) y en el metabolismo de lípidos de membrana (AzCIB_1233-1235; AzCIB_3290-3296). Estos resultados, están de acuerdo con una serie de fenotipos diferenciales observados en la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIBdtolR creciendo en piruvato, como son la aparición de agregados celulares visibles al microscopio, un depósito a modo de biopelícula estable en el fondo de las botellas de cultivo, o el incremento de tamaño de las células, que no se observan en la cepa parental (Figs. 42, 43 y 44). Estos fenotipos son similares a los descritos en la literatura cuando se eliminan proteínas que disminuyen los niveles de di-GMPc, como la proteína BdcA de *E. coli* BW25113, que une y disminuye los niveles locales de di-GMPc sin degradarlo, lo que se traduce en un aumento en la formación de biopelículas, de agregados celulares y en el tamaño celular (Ma y cols., 2011). Por lo tanto, y pendiente de un análisis más detallado de los datos generados con los experimentos de transcriptómica y su confirmación mediante otras técnicas experimentales, se puede concluir que TolR y, por tanto, los niveles de di-GMPc, tienen un efecto pleiotrópico en *Azoarcus* sp. CIB, más allá del control específico de la adaptación a hidrocarburos aromáticos, controlando otros fenotipos como los descritos anteriormente (Fig. 50). Dado que la mutación del gen *tolR* supuestamente incrementa la concentración de di-GMPc en *Azoarcus* sp. CIBdtolR, otra forma diferente de incrementar la concentración de este segundo mensajero sería clonar y expresar una DGC activa. En este sentido, cuando se clonó en *Azoarcus* sp. CIB la DGC PP_4959 de *P. putida* (Matilla y cols., 2011), se observó que, respecto a la cepa parental CIB, los cultivos incrementaban la fase de latencia y la producción de gránulos de PHB utilizando piruvato como fuente de carbono, fenotipos similares a los observados con el mutante *Azoarcus* sp. CIBdtolR (datos no mostrados), y que vuelven a confirmar que los niveles de di-GMPc modulan diferentes tipos de respuestas celulares en *Azoarcus* sp. CIB. Por otra parte, comprobando la expresión entre los DEG de otros genes relacionados con el metabolismo del di-GMPc podemos decir que, la pérdida de actividad de *tolR* no está compensada con la de otras presuntas PDE en *Azoarcus* sp. CIB, como ya se ha observado en otras bacterias (Ferreira y cols., 2013).

Los posibles receptores celulares de di-GMPc en la cascada de señalización controlada por la proteína TolR y que contribuye a la adaptación al consumo anaeróbico de hidrocarburos aromáticos en *Azoarcus* sp. CIB, no son conocidos. En este sentido, entre los genes diferencialmente expresados en los estudios de transcriptómica se han identificado una serie de posibles reguladores con dominios que podrían interaccionar con el di-GMPc. Así, por ejemplo, los genes que codifican AzCIB_0575 (posible regulador de respuesta) y AzCIB_2893 (posible serina/treonina quinasa) se encuentran reprimidos en la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIBdtolR respecto a la cepa parental CIB tras un choque de tolueno, y ambas proteínas contienen un dominio AAA⁺/ATPase similar al dominio de unión de di-GMPc descrito para el regulador transcripcional FleQ de *P. aeruginosa* (Baraquet y cols., 2012; Baraquet y Harwood, 2013). También están reprimidos en la cepa mutante *tolR* los genes AzCIB_1216 (posible UspA; *Universal stress protein*) y AzCIB_2409 (posible regulador transcripcional), que codifican proteínas con dominios *cyclic nucleotide-binding* similares a los descritos en proteínas reguladoras de la familia CRP/FNR y que interaccionan con di-GMPc (Leduc y Roberts, 2009; Chin y cols., 2009; Fazli y cols., 2011). Finalmente, se ha identificado una proteína, AzCIB_1025, que posee un dominio CZB similar al que interacciona con di-GMPc y se localiza en receptores implicados en quimiotaxis, movilidad y en señalización por di-GMPc (Draper y cols., 2011), y cuyo gen está más reprimido tras el choque de tolueno en la cepa *Azoarcus* sp. CIBdtolR que en la cepa parental *Azoarcus* sp. CIB. Otros genes que codifican proteínas con dominios similares a algunos de los descritos en la literatura que reconocen di-GMPc, como por ejemplo la única proteína con dominio PilZ de unión a di-GMPc presente en el genoma de *Azoarcus* sp. CIB (AzCIB_2825) y dos posibles reguladores transcripcionales (AzCIB_2231; AzCIB_2292) de la familia CRP/FNR similares al regulador Bcam1349 de *B. cenocepacia* que interacciona con di-GMPc (Fazli y cols., 2011), no aparecen diferencialmente expresados en los estudios de transcriptómica realizados en este trabajo.

En conclusión, estos estudios ponen de manifiesto la existencia de posibles genes implicados en la cascada de señalización controlada por TolR y mediada por los niveles de di-GMPc en *Azoarcus* sp. CIB (Fig. 50). La confirmación de que alguno de estos genes está realmente implicado en la cascada de señalización controlada por TolR

necesitará de otros abordajes experimentales complementarios, y la posterior caracterización de los genes confirmados será objeto de trabajo futuro.

4. Modelo del mecanismo de acción propuesto para TolR en *Azoarcus* sp. CIB

A la luz de todos los resultados recogidos en esta Tesis Doctoral, se postula un mecanismo de acción para la proteína TolR que se resume en la figura 51. En presencia de hidrocarburos aromáticos (inductores), la interacción de éstos con el bolsillo de reconocimiento del dominio PAS de la proteína TolR incrementa significativamente la autofosforilación de la His¹⁹⁰ del dominio AK. La posterior transferencia intramolecular del fosfato al residuo Asp⁴⁹⁹ del dominio REC provoca un cambio conformacional del supradominio catalítico que se traduce en un incremento en la actividad PDE de di-GMPc. La consiguiente disminución de los niveles de di-GMPc en *Azoarcus* sp. CIB dispara una cascada de señalización celular que permite a la bacteria adaptarse al consumo y estrés ocasionado por los hidrocarburos aromáticos en condiciones anaeróbicas. La adaptación al consumo implica, entre otros procesos, una respuesta quimiotáctica positiva hacia los hidrocarburos, facilitando así su degradación. La adaptación al estrés ocasionado por concentraciones tóxicas de los hidrocarburos implica, entre otros procesos, cambios en las envueltas celulares y en el metabolismo general de la célula.

En ausencia de compuestos inductores, la actividad basal autoquinasa de TolR también ejerce un papel regulador sobre el contenido global de di-GMPc en la célula, y modula procesos tales como la síntesis de lípidos y polisacáridos de membrana que influyen en la formación de biopelículas y agregación celular.

En conclusión, la proteína TolR constituye el primer ejemplo de un sistema de transducción de señales de dos componentes híbrido (HTCS) directamente implicado en un novedoso mecanismo de adaptación anaeróbica a los hidrocarburos aromáticos mediando la regulación de los niveles de di-GMPc en *Azoarcus* sp. CIB. Este trabajo abre además una interesante línea de investigación futura conducente a la identificación y estudio de otros elementos implicados en la cascada de señalización controlada por TolR, y sus posibles aplicaciones biotecnológicas en el diseño de organismos biodegradadores de hidrocarburos aromáticos más eficaces y robustos.

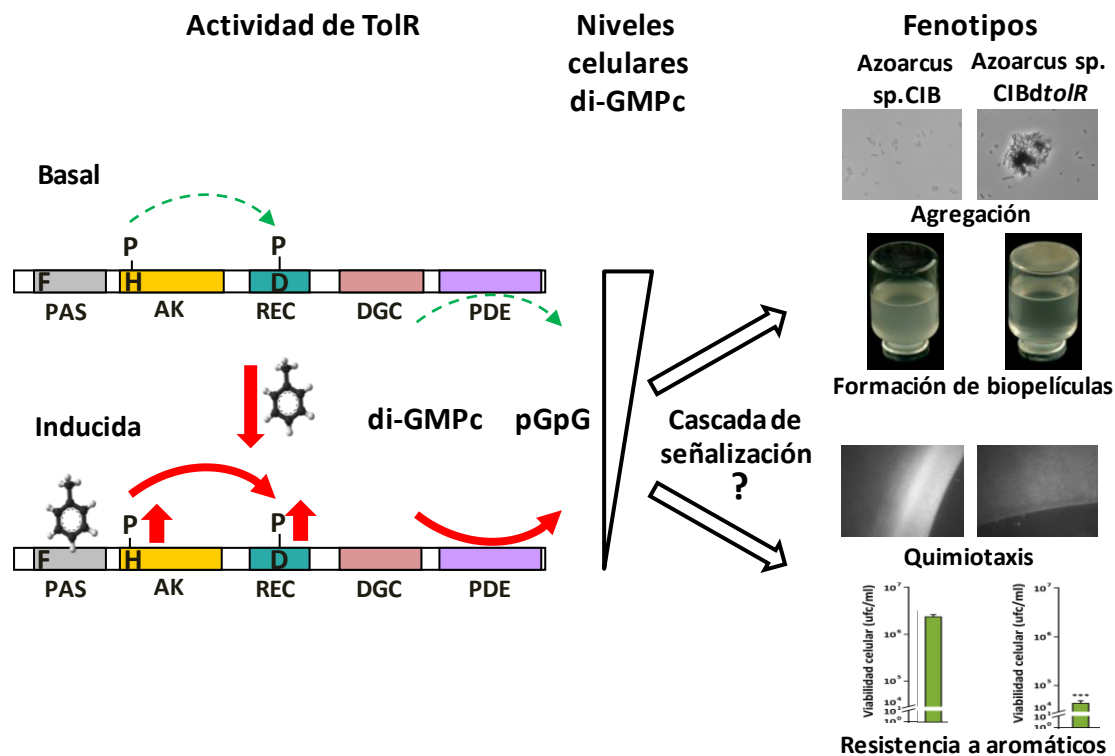


Figura 51. Modelo del mecanismo de acción de TolR. A) **Actividad basal de TolR.** En ausencia de inductor, hay una baja autofosforilación del dominio AK y, por tanto, una baja transferencia al dominio REC que supone una baja actividad PDE de di-GMPc. B) **Actividad inducida de TolR.** En presencia del inductor (tolueno) hay un aumento de unas 5 veces de la autofosforilación del dominio AK y de la transferencia del fosfato al dominio REC, induciendo la actividad PDE y generando una reducción de los niveles de di-GMPc celulares. Los niveles de di-GMPc controlan la respuesta de adaptación anaeróbica de *Azoarcus* sp. CIB a los hidrocarburos aromáticos y también modulan aspectos metabólicos y morfológicos generales independientes de la presencia de hidrocarburos, a través de una cascada de señalización que todavía no es conocida. Se muestran algunos de los fenotipos que caracterizan a la cepa parental *Azoarcus* sp. CIB y a la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIBdtolR.

VIII. CONCLUSIONES

- El gen *tolR* representa un nuevo elemento regulador que controla la adaptación de *Azoarcus* sp. CIB a los hidrocarburos aromáticos, en condiciones anaeróbicas. Así, *tolR* controla la quimiotaxis hacia los hidrocarburos aromáticos, y está implicado en la respuesta de *Azoarcus* sp. CIB al estrés causado por una elevada concentración de tolueno.
- TolR constituye el primer sistema regulador de dos componentes híbrido (HTCS) que se caracteriza en una bacteria que no pertenece al grupo de los Bacteroides y cuyo dominio efector no es un dominio de unión a DNA sino una fosfodiesterasa (PDE) de di-GMPc activa en condiciones anaeróbicas. La implicación del segundo mensajero di-GMPc en la adaptación bacteriana a los hidrocarburos aromáticos no había sido descrita hasta la fecha.
- Los residuos Phe⁷⁹, implicado en la interacción del dominio sensor PAS con las moléculas inductoras (principalmente hidrocarburos aromáticos), e His¹⁹⁰, del dominio autoquinasa, son esenciales para la inducción dependiente de efector de la actividad autoquinasa de TolR, la cual a su vez es necesaria para la activación del dominio efector que hidroliza di-GMPc. Por otro lado, se ha demostrado la transferencia de fosfato intramolecular del dominio autoquinasa al dominio *receiver* de TolR, siendo la autofosforilación de la proteína en el dominio autoquinasa la reacción más favorecida en presencia del inductor.
- Se ha evolucionado *in vitro* TolR hacia un sistema regulador de dos componentes clásico (CTCS), TolR_{SK}-TolR_{RR}, que es capaz de reproducir *in vitro* la cascada de trans-fosforilación típica de los CTCS. Este sistema también es funcional *in vivo* y responde a la presencia de tolueno como inductor, generando una respuesta adaptativa similar a la mediada por TolR en *Azoarcus* sp. CIB. Sin embargo, el sistema TolR_{SK}-TolR_{RR} muestra un mayor nivel de actividad basal y una respuesta tras la inducción menos eficiente que la del sistema nativo TolR, confirmando por primera vez la hipótesis sobre las ventajas de eficiencia y rapidez que se presuponen a los sistemas HTCS sobre los CTCS.

- El gen *tolR* también está implicado, muy probablemente por su actividad PDE de di-GMPc basal, en el crecimiento anaeróbico de *Azoarcus* sp. CIB en fuentes de carbono no aromáticas, como lo demuestra el hecho de que su inactivación genera en *Azoarcus* sp. CIB *dtolR* retraso en el crecimiento, aumento del tamaño celular, aparición de agregados celulares en fases tempranas, y un depósito a modo de biopelícula en fases tardías del crecimiento en piruvato.
- Los análisis transcriptómicos realizados comparando la cepa parental, *Azoarcus* sp. CIB, con la cepa mutante, *Azoarcus* sp. CIB *dtolR*, cultivadas anaeróbicamente en piruvato o sometidas a un choque de tolueno sugieren alteraciones significativas en la maquinaria de quimiotaxis, en las envolturas celulares y en el metabolismo general de la célula, que están de acuerdo con los fenotipos observados y con la menor viabilidad de la cepa mutante en presencia de concentraciones tóxicas de hidrocarburo. El mayor número de genes diferencialmente expresados entre ambas cepas tras el choque de tolueno, está de acuerdo con el hecho de que en esta situación se induce la actividad PDE de di-GMPc de TolR y está significativamente alterada la red de señalización celular. Estos estudios sientan las bases para profundizar en la cascada de regulación controlada por TolR en *Azoarcus* sp. CIB.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- **Achong, G.R., Rodríguez, A.M. y Spormann, A.M. (2001).** Benzylsuccinate synthase of *Azoarcus* sp. strain T: cloning, sequencing, transcriptional organization, and its role in anaerobic toluene and *m*-xylene mineralization. *J Bacteriol* 183, 6763-6770.
- **Adler, E. (1977).** Lignin chemistry past, present and future. *Wood Science and Technology* 11, 169-218.
- **Alm, E., Huang, K., and Arkin, A. (2006).** The evolution of two-component systems in bacteria reveals different strategies for niche adaptation. *PLoS computational biology* 2, e143.
- **Anders, H.J., Kaetzke, A., Kampfer, P., Ludwig, W. y Fuchs, G. (1995).** Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying pseudomonad strains K 172 and KB 740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. nov. y *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of the Proteobacteria. *Int J Syst Bacteriol* 45, 327-333.
- **Armstrong, J.B. y Adler, J. (1969).** Location of genes for motility and chemotaxis on the *Escherichia coli* genetic map. *J Bacteriol* 97(1), 156-161.
- **Ashby, M. K. (2004).** Survey of the number of two-component response regulator genes in the complete and annotated genome sequences of prokaryotes. *FEMS Microbiol Lett* 231, 277-281.
- **Ashby, M.K. (2006).** Distribution, structure and diversity of "bacterial" genes encoding two-component proteins in the Euryarchaeota. *Archaea Vancouver, BC* 2, 11-30.
- **Audic, S. y Claverie, J.M. (1997).** The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res* 7(10), 986-995.
- **Baker, M.D., Wolanin, P.M. y Stock, J.B. (2006).** Systems biology of bacterial chemotaxis. *Curr Opin Microbiol* 9(2), 187-192.
- **Barakat, M., Ortet, P., Jourlin-Castelli, C., Ansaldi, M., Méjean, V. y Whitworth, D.E. (2009).** P2CS: a two-component system resource for prokaryotic signal transduction research. *BMC Genomics*. 10:315

- **Barakat, M., Ortet, P. y Whitworth, D.E. (2011).** P2CS: a database of prokaryotic two-component systems. *Nucleic Acids Res.* 39.
- **Baraquet, C., Murakami, K., Parsek, M.R. y Harwood, C.S. (2012).** The FleQ protein from *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene expression from the *pel* operon promoter in response to c-di-GMP. *Nucleic Acids Res* 40(15), 7207-7218.
- **Baraquet, C. y Harwood, C.S. (2013).** Cyclic diguanosine monophosphate represses bacterial flagella synthesis by interacting with the Walker A motif of the enhancer-binding protein FleQ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(46), 18478-18483.
- **Barends, T.R., Hartmann, E., Griese, J.J., Beitlich, T., Kirienko, N.V., Ryjenkov, D.A., Reinstein, J., Shoeman, R.I., Gomelsky, M. y Schlichting, I. (2009).** Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Nature* 459, 1015–1018.
- **Benjamini, Y. y Yekutieli, D. (2001).** The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Ann Statist* 29(4), 1165-1188.
- **Bharati, B.K., Sharma, I.M., Kasetty, S., Kumar, M., Mukherjee, R. y Chatterji, D. (2012).** A full length bifunctional protein involved in c-di-GMP turnover is required for long term survival under nutrient starvation in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* 158, 1415–1427.
- **Blázquez, B. (2009).** Caracterización molecular de la degradación anaeróbica de tolueno y *m*-xileno en *Azoarcus* sp. CIB. Tesis Doctoral.
- **Bobrov, A.G., Kirillina, O. y Perry, R.D. (2005).** The phosphodiesterase activity of the HmsP EAL domain is required for negative regulation of biofilm formation in *Yersinia pestis*. *FEMS Microbiol Lett* 247(2), 123-130.
- **Bobrov, A.G., Kirillina, O., Forman, S., Mack, D. y Perry, R.D. (2008).** Insights into *Yersinia pestis* biofilm development: topology and co-interaction of Hms inner membrane proteins involved in exopolysaccharide production. *Environ Microbiol* 10, 1419–1432.

- **Boll, M., Löffler, C., Morris, B.E. y Kung, J.W. (2014).** Anaerobic degradation of homocyclic aromatic compounds via arylcarboxyl-coenzyme A esters: organisms, strategies and key enzymes. *Environ Microbiol* 16(3), 612-627.
- **Borlee, B.R., Goldman, A.D., Murakami, K., Samudrala, R., Wozniak, D.J. y Parsek, M.R. (2010).** *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Mol Microbiol* 75(4), 827-842.
- **Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- **Burbulys, D., Trach, K.A. y Hoch, J.A. (1991).** Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell* 64(3), 545-552.
- **Buelow, D.R. y Raivio, T.L. (2010).** Three (and more) component regulatory systems - auxiliary regulators of bacterial histidine kinases. *Mol Microbiol* 75(3), 547-566.
- **Busch, A., Lacal, J., Martos, A., Ramos, J.L. y Krell, T. (2007).** Bacterial sensor kinase TodS interacts with agonistic and antagonistic signals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(34), 13774-13779.
- **Busch, A., Guazzaroni, M. E., Lacal, J., Ramos, J.L. y Krell, T. (2009).** The sensor kinase TodS operates by a multiple step phosphorelay mechanism involving two autokinase domains. *J Biol Chem.* 284(16), 10353-10360.
- **Busch, A., Lacal, J., Silva-Jiménez, H., Ramos, J.L. y Krell, T. (2010).** Catabolite repression of the TodS/TodT two-component system and effector-dependent transphosphorylation of TodT as the basis for toluene dioxygenase catabolic pathway control. *J Bacteriol.* 192(16), 4246-4250.
- **Capra, E.J., Perchuk, B.S., Lubin, E.A., Ashenberg, O., Skerker, J.M. y Laub, M.T. (2010).** Systematic dissection and trajectory-scanning mutagenesis of the molecular interface that ensures specificity of two-component signaling pathways. *PLoS Genet* 6(11), e1001220.
- **Capra, E.J. y Laub, M.T. (2012).** Evolution of Two-Component Signal Transduction Systems. *Annu Rev Microbiol* 66, 325-347.

- **Carmona, M., Prieto, M. A., Galán, B., García, J. L. y Díaz, E. (2008).** Signaling networks and design of pollutants biosensors. In E. Díaz (ed.), *Microbial Biodegradation: genomics and molecular biology*. Caister Academic Press, Norfolk, UK. p. 97-143
- **Carmona, M., Zamarro, M.T., Blázquez, B., Durante-Rodríguez, G., Juárez, J.F., Valderrama, J.A., Barragán, M.J., García, J.L. y Díaz, E. (2009).** Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view. *Microbiol Mol Biol Rev* 73, 71-133.
- **Cases, I. y de Lorenzo, V. (2005).** Genetically modified organisms for the environment: stories of success and failure and what we have learned from them. *Int Microbiol* 8, 213-222.
- **Camilli, A. y Bassler, B.L. (2006).** Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science* 311, 1113–1116.
- **Casino, P., Rubio, V. y Marina A. (2009).** Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction. *Cell* 139(2), 325-336.
- **Casino, P., Rubio, V. y Marina A. (2010).** The mechanism of signal transduction by two-component systems. *Curr Opin Struct Biol* 20(6), 763-771.
- **Chambers, J.R., Liao, J., Schurr, M.J. y Sauer, K. (2014).** BrlR from *Pseudomonas aeruginosa* is a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol Microbiol* 92(3), 471-487.
- **Chan, C., Paul, R., Samoray, D., Amiot, N.C., Giese, B., Jenal, U. y Schirmer, T. (2004).** Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17084 –17089.
- **Cheung, J. y Hendrickson, W. A. (2010).** Sensor Domains of Two-Component Regulatory Systems. *Curr Opin Microbiol* 13(2), 116–123.
- **Chin, K.H., Lee, Y.C., Tu, Z.L., Chen, C.H., Tseng, Y.H., Yang, J.M., Ryan, R.P., McCarthy, Y., Dow, J.M., Wang, A.H. y Chou, S.H. (2010).** The cAMP receptor-like protein CLP is a novel cyclic di-GMP receptor linking cell-cell signalling to virulence gene expression in *Xanthomonas campestris*. *J Mol Biol* 396, 646–662.

- **Christen, M., Christen, B., Folcher, M., Schauerte, A. y Jenal, U. (2005).** Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J Biol. Chem* 280, 30829-30837.
- **Christen, B., Christen, M., Paul, R., Schmid, F., Folcher, M., Jenoe, P., Meuwly, M. y Jenal, U. (2006).** Allosteric control of cyclic di-GMP signaling. *J Biol Chem* 281, 32015–32024.
- **Christen, M., Christen, B., Allan, M.G., Folcher, M., Jenoe, P., Grzesiek, S. y Jenal, U. (2007).** DgrA is a member of a new family of cyclic diguanosine monophosphate receptors and controls flagellar motor function in *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4112– 4117.
- **Coates, J.D., Chakraborty, R. y McInerney, M.J. (2002).** Anaerobic benzene biodegradation--a new era. *Res Microbiol* 153, 621-628.
- **Coates, J.D. y Achenbach, L.A. (2004).** Microbial perchlorate reduction: rocket-fueled metabolism. *Nat Rev Microbiol* 2(7), 569-580.
- **Cock P.J. y Whitworth D.E. (2007).** Evolution of prokaryotic two-component system signaling pathways: gene fusions and fissions. *Mol Biol Evol* 24(11), 2355-2357.
- **Coschigano, P. W., y Young, L. Y. (1997).** Identification and sequence analysis of two regulatory genes involved in anaerobic toluene metabolism by strain T1. *Appl Environ Microbiol* 63, 652-660.
- **de Lorenzo, V. (2008).** Systems biology approaches to bioremediation. *Curr Opin Biotechnol* 19(6), 579-59.
- **de Philip, P., Batut y J., Boistard, P. (1990).** *Rhizobium meliloti* Fix L is an oxygen sensor and regulates *R. meliloti nifA* and *fixK* genes differently in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 172(8), 4255-4562.
- **de Smet, M. J., Kingma, J. y Witholt. B. (1978).** The effect of toluene on the structure and permeability of the outer and cytoplasmic membranes of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 506:64-80.
- **Díaz, E. (2004).** Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *Int Microbiol* 7, 173-180.

- **Díaz, E., Jiménez, J.I. y Nogales, J. (2013).** Aerobic degradation of aromatic compounds. *Curr Opin Biotechnol* 24(3), 431-442.
- **Djordjevic, S. y Stock, A.M. (1998).** Structural analysis of bacterial chemotaxis proteins: components of a dynamic signaling system. *J Struct Biol* 124(2-3), 189-200.
- **Domínguez-Cuevas, P., González-Pastor, J. E., Marqués, S., Ramos, J. L. y de Lorenzo, V. (2006).** Transcriptional tradeoff between metabolic and stress-response programs in *Pseudomonas putida* KT2440 cells exposed to toluene. *J Biol Chem* 281, 11981-11991.
- **Draper, J., Karplus, K. y Ottemann, K.M. (2011).** Identification of a chemoreceptor zinc-binding domain common to cytoplasmic bacterial chemoreceptors. *J Bacteriol* 193(17), 4338-4345
- **Durante-Rodríguez, G., Zamarro, M.T., García, J.L., Díaz, E. y Carmona, M. (2006).** Oxygen-dependent regulation of the central pathway for the anaerobic catabolism of aromatic compounds in *Azoarcus* sp. strain CIB. *J Bacteriol* 188(7), 2343-2354.
- **Durante-Rodríguez, G., Zamarro, M.T., García, J.L., Díaz, E. y Carmona, M. (2008).** New insights into the BzdR-mediated transcriptional regulation of the anaerobic catabolism of benzoate in *Azoarcus* sp. CIB. *Microbiology*. 154(Pt 1), 306-316.
- **Durante-Rodríguez, G., Valderrama, J.A., Mancheño, J.M., Rivas, G., Alfonso, C., Arias-Palomo, E., Llorca, O., García, J.L., Díaz, E. y Carmona, M. (2010).** Biochemical characterization of the transcriptional regulator BzdR from *Azoarcus* sp. CIB. *J Biol Chem* 285(46), 35694-35705.
- **Fazli, M., O'Connell, A., Nilsson, M., Niehaus, K., Dow, J.M., Givskov, M., Ryan, R.P. y Tolker-Nielsen, T. (2009).** The CRP/FNR family protein Bcam1349 is a c-di-GMP effector that regulates biofilm formation in the respiratory pathogen *Burkholderia cenocepacia*. *Mol Microbiol* 82(2), 327-341.
- **Ferreira, A.S., Silva, I.N., Oliveira, V.H., Becker, J.D., Givskov, M., Ryan, R.P., Fernandes, F. y Moreira, L.M. (2013).** Comparative transcriptomic analysis of the *Burkholderia cepacia* tyrosine kinase bceF mutant reveals a role in

- tolerance to stress, biofilm formation, and virulence. *Appl Environ Microbiol* 79(9), 3009-3020.
- **Ferreira, R.B., Chodur, D.M., Antunes, L.C., Trimble, M.J. y McCarter, L.L. (2012).** Output targets and transcriptional regulation by a cyclic dimeric GMP-responsive circuit in *the Vibrio parahaemolyticus* Scr network. *J Bacteriol* 194(5), 914-924.
 - **Foght, J. (2008).** Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: pathways and prospects. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 15(2-3), 93-120.
 - **Fries, M.R., Zhou, J., Chee-Sanford, J. y Tiedje, J.M. (1994).** Isolation, characterization, and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. *Appl Environ Microbiol* 60, 2802-2810.
 - **Fuchs, G. (2008).** Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Ann N Y Acad Sci* 1125, 82-99.
 - **Fuchs, G., Boll, M. y Heider, J. (2011).** Microbial degradation of aromatic compounds - from one strategy to four. *Nat Rev Microbiol* 9(11), 803-816.
 - **Galperin, M.Y. (2001).** Conserved 'Hypothetical' Proteins: New Hints and New Puzzles. *Comp Funct Genomics*. 2(1), 14-18.
 - **Galperin, M.Y. (2004).** Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environ Microbiol* 6, 552-567.
 - **Galperin, M.Y. (2006).** Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *J Bacteriol* 188, 4169-4182.
 - **Galperin, M.Y. (2010).** Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Curr Opin Microbiol* 13(2), 150-159.
 - **Gao, R., Mack, T.R., y Stock, A.M. (2007).** Bacterial response regulators: versatile regulatory strategies from common domains. *Trends in biochem sciences* 32, 225-234.
 - **Gao, R. y Stock, A. M. (2009).** Biological insights from structures of twocomponent proteins. *Annu Rev Microbiol* 63, 133-154.
 - **Gibson, J. y Harwood, C.S. (2002).** Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. *Annu Rev Microbiol* 56, 345-369.

- **Girgis, H.S., Liu, Y., Ryu, W.S. y Tavazoie, S. (2007).** A comprehensive genetic characterization of bacterial motility. *PLoS Genet* 3, 1644–1660.
- **Grebe, T.W. y Stock, J. (1998).** Bacterial chemotaxis: the five sensors of a bacterium. *Curr Biol* 8(5), R154-157.
- **Grebe, T.W. y Stock, J. (1999).** The histidine protein kinase superfamily. *Adv Microb Physiol* 41, 139-227.
- **Güvener, Z.T. y Harwood, C.S. (2007).** Subcellular location characteristics of the *Pseudomonas aeruginosa* GGDEF protein, WspR, indicate that it produces cyclic-di-GMP in response to growth on surfaces. *Mol Microbiol* 66, 1459 – 1473.
- **Harayama, S. y Timmis, K.N. (1989).** Catabolism of aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas*, p. 151-174. En D.A. Hopwood (ed.). *Genetics of bacterial diversity*. Academic Press Inc., Nueva York, E.E.U.U.
- **Hasegawa, Y., Nishiyama, S., Nishikawa, K., Kadowaki, T., Yamamoto, K., Noguchi, T. y Yoshimura, F. (2003).** A novel type of two-component regulatory system affecting gingipains in *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Immunol* 47(11), 849-858.
- **Hazelbauer, G.L., Falke, J.J. y Parkinson, J.S. (2008).** Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays. *Trends Biochem Sci* 33(1), 9-19.
- **Hefti, M.H., François, K.J., de Vries, S.C., Dixon, R. y Vervoort, J. (2004).** The PAS fold. A redefinition of the PAS domain based upon structural prediction. *Eur J Biochem* 271(6), 1198-1208.
- **Heider, J. y Fuchs, G. (1997).** Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Eur J Biochem* 243, 577-596.
- **Hengge, R. (2009).** Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 7(4), 263-73.
- **Henry, J.T. y Crosson, S. (2011).** Ligand-binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context. *Annu Rev Microbiol* 65, 261-286.
- **Hess, A., Zarda, B., Hahn, D., Haner, A., Stax, D., Hohener, P. y Zeyer, J. (1997).** In situ analysis of denitrifying toluene- and m-xylene-degrading bacteria in a

- diesel fuel-contaminated laboratory aquifer column. *Appl Environ Microbiol* 63, 2136-2141.
- **Hickman, J. W., Tifrea, D. F. y Harwood, C. S. (2005).** A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102, 14422-14427.
 - **Hickman, J. W., y Harwood, C. S. (2008).** Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol Microbiol* 69, 376-389.
 - **Hirano, T., Beck, D.A., Wright, C.J., Demuth, D.R., Hackett, M. y Lamont, R.J. (2012).** Regulon controlled by the GppX hybrid two component system in *Porphyromonas gingivalis*. *Mol Oral Microbiol* 28(1), 70-81.
 - **Hoch, J.A. (2000).** Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr opin in Microb* 3, 165-170.
 - **Ikegami, T., Okada, T., Ohki, I., Hirayama, J., Mizuno, T. y Shirakawa, M. (2001).** Solution structure and dynamic character of the histidine-containing phosphotransfer domain of anaerobic sensor kinase ArcB from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 40(2), 375-386.
 - **Inouye, M. (2006).** Signaling by transmembrane proteins shifts gears. *Cell* 126, 829-831.
 - **Ishige, K., Nagasawa, S., Tokishita, S. y Mizuno, T. (1994).** A novel device of bacterial signal transducers. *EMBO J* 13(21), 5195-5202.
 - **Jackson, D. W., Suzuki, K., Oakford, L., Simecka, J. W., Hart, M. E. y Romeo, T. (2002).** Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184, 290-301.
 - **Jiménez, J.I., Juárez, J.F., García, J.L. y Díaz, E. (2011).** A finely tuned regulatory circuit of the nicotinic acid degradation pathway in *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* 13(7), 1718-1732.
 - **Jonas, K., Edwards, A. N., Simm, R., Romeo, T., Römling, U. y Melefors, Ö. (2008).** The RNA binding protein CsrA controls cyclic di-GMP metabolism by directly regulating the expression of GGDEF proteins. *Mol Microbiol* 70, 236-257.

- **Juárez, J.F., Zamarro, M.T., Eberlein, C., Boll, M., Carmona, M. y Díaz, E. (2013).** Characterization of the *mbd* cluster encoding the anaerobic 3-methylbenzoyl-CoA central pathway. *Environ Microbiol* 15(1), 148-166.
- **Junker, F., Rodríguez-Herva, J.J., Duque, E., Ramos-González, M.I., Llamas, M. y Ramos, J.L. (2001).** A WbpL mutant of *Pseudomonas putida* DOT-T1E strain, which lacks the O-antigenic side chain of lipopolysaccharides, is tolerant to organic solvent shocks. *Extremophiles* 5, 93–99.
- **Jyot, J., Dasgupta, N. y Ramphal, R. (2002).** FleQ, the major flagellar gene regulator in *Pseudomonas aeruginosa*, binds to enhancer sites located either upstream or atypically downstream of the RpoN binding site. *J Bacteriol* 184(19), 5251-5260.
- **Kalia, D., Merey, G., Nakayama, S., Zheng, Y., Zhou, J., Luo, Y., Guo, M., Roembke, B.T. y Sintim, H.O. (2012).** Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis. *Chem Soc Rev* 42(1), 305-341.
- **Kane, S.R., Beller, H.R., Legler, T.C. y Anderson, R.T. (2002).** Biochemical and genetic evidence of benzylsuccinate synthase in toluene-degrading, ferric iron-reducing *Geobacter metallireducens*. *Biodegradation* 13(2), 149-154.
- **Kanehisa, M. y Goto, S. (2000).** KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 28(1), 27-30.
- **Karaolis, D.K., Means, T.K., Yang, D., Takahashi, M., Yoshimura, T., Muraille, E., Philpott, D., Schroeder, J.T., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Talbot, B.G., Brouillette, E., Malouin, F. (2007).** Bacterial c-di-GMP is an immunostimulatory molecule. *J Immunol* 178, 2171–2181.
- **Karp, P.D., Paley, S. y Romero, P. (2002).** The Pathway Tools software. *Bioinformatics* 18 Suppl 1, S225-232.
- **Kazmierczak, B.I., Lebron, M.B. y Murray, T.S. (2006).** Analysis of FimX, a phosphodiesterase that governs twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 60(4), 1026-43.

- **Kim, Y.K., y McCarter, L.L. (2007).** ScrG, a GGDEF-EAL protein, participates in regulating swarming and sticking in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* 189(11), 4094-4107.
- **Kleerebezem, M., Quadri, L. E., Kuipers, O. P. y de Vos, W. M. (1997).** Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 24, 895-904.
- **Krasteva, P.V., Fong, J.C., Shikuma, N.J., Beyhan, S., Navarro, M.V., Yildiz, F.H. y Sondermann, H. (2010).** *Vibrio cholerae* VpsT regulates matrix production and motility by directly sensing cyclic di-GMP. *Science* 327(5967), 866-868.
- **Krasteva, P.V., Giglio, K.M. y Sondermann, H. (2012).** Sensing the messenger: the diverse ways that bacteria signal through c-di-GMP. *Protein Sci* 21, 929–948.
- **Krell, T., Busch, A., Lacal, J., Silva-Jimenez, H. y Ramos, J. L. (2009).** The enigma of cytosolic two-component systems: a hypothesis. *Environ Microbiol* 1(3), 171-176.
- **Krell, T., Lacal, J., Busch, A., Silva-Jimenez, H., Guazzaroni, M. E. y Ramos, J. L. (2010).** Bacterial sensor kinases: diversity in the recognition of environmental signals. *Annu Rev Microbiol* 64, 539-559.
- **Krell, T., Lacal, J., Reyes-Darias, J.A., Jimenez-Sanchez, C., Sungthong, R. y Ortega-Calvo, J.J. (2013).** Bioavailability of pollutants and chemotaxis. *Curr Opin Biotechnol* 24(3), 451-456.
- **Krell, T., Lacal, J., Guazzaroni, M.E., Busch, A., Silva-Jiménez, H., Fillet, S., Reyes-Darías, J.A., Muñoz-Martínez, F., Rico-Jiménez, M., García-Fontana, C., Duque, E., Segura, A., Ramos, J.L. (2012).** Responses of *Pseudomonas putida* to toxic aromatic carbon sources. *J Biotechnol* 160(1-2), 25-32.
- **Kube, M., Heider, J., Amann, J., Hufnagel, P., Kühner, S., Beck, A., Reinhardt, R. y Rabus, R. (2004).** Genes involved in the anaerobic degradation of toluene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch Microbiol* 181, 182- 194.
- **Kuchma, S.L., Brothers, K.M., Merritt, J.H., Liberati, N.T., Ausubel, F.M. y O'Toole, G.A. (2007).** BifA, a cyclic-di-GMP phosphodiesterase, inversely

- regulates biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol* 189, 8165–8178.
- **Kuchma, S.L., Delalez, N.J., Filkins, L.M., Snaveley, E.A., Armitage, J.P. y O'Toole, G.A. (2014).** c-di-GMP-Mediated Repression of Swarming Motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14 requires the MotAB Stator. *J Bacteriol*. Online Oct 27.
 - **Labbé D., Garnon, J. y Lau P.C. (1997).** Characterization of the genes encoding a receptor-like histidine kinase and a cognate response regulator from a biphenyl/polychlorobiphenyl-degrading bacterium, *Rhodococcus* sp. Strain M5. *J Bacteriol* 179, 2772-2776.
 - **Lacal, J., Busch, A., Guazzaroni, M. E., Krell, T. y Ramos J. L. (2006).** The TodS/TodT two-component regulatory system recognizes a wide range of effectors and works with DNA-bending proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 8191-8192.
 - **Lacal, J., Guazzaroni, M. E., Busch, A., Krell, T. y Ramos J. L. (2008).** Hierarchical binding of the TodT response regulator to its multiple recognition sites at the *tod* pathway operon promoter. *J Mol Biol* 376, 325-337.
 - **Lacal, J., Muñoz-Martínez, F., Reyes-Darías, J.A., Duque, E., Matilla, M., Segura, A., Calvo, J.J., Jiménez-Sánchez, C., Krell, T., Ramos, J.L. (2011).** Bacterial chemotaxis towards aromatic hydrocarbons in *Pseudomonas*. *Environ Microbiol* 13(7), 1733-1744.
 - **Lacal, J., Reyes-Darias, J.A., García-Fontana, C., Ramos, J.L. y Krell, T. (2012).** Tactic responses to pollutants and their potential to increase biodegradation efficiency. *J Appl Microbiol* 114(4), 923-933.
 - **Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
 - **Lau, P.C., Wang, Y., Patel, A., Labbe, D., Bergeron, H., Brousseau, R., Konishi, Y. y Rawlings, M. (1997).** A bacterial basic region leucine zipper histidine kinase regulating toluene degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1453-1458.
 - **Laub, M. T., Biondi, E. G. y Skerker, J. M. (2007).** The molecular puzzle of two component signaling cascades. *Methods Enzymol* 423, 531-548.

- **Leduc, J.L. y Roberts, G.P. (2009).** Cyclic di-GMP allosterically inhibits the CRP-like protein (Clp) of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. *J Bacteriol* 191(22), 7121-7122.
- **Lee, V.T., Matewish, J.M., Kessler, J.L., Hyodo, M., Hayakawa, Y. y Lory, S. (2007).** A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol Microbiol* 65, 1474–1484.
- **Leuthner, B., y J. Heider. (1998).** A two-component system involved in regulation of anaerobic toluene metabolism in *Thauera aromatica*. *FEMS Microbiol. Lett.* 166, 35-41.
- **Leuthner, B. y Heider, J. (2000).** Anaerobic toluene catabolism of *Thauera aromatica*: the *bbs* operon codes for enzymes of beta oxidation of the intermediate benzylsuccinate. *J Bacteriol* 182, 272-277.
- **Li, W., He, Z.G. (2012).** LtmA, a novel cyclic di-GMP-responsive activator, broadly regulates the expression of lipid transport and metabolism genes in *Mycobacterium smegmatis*. *Nucleic Acids Res* 40(22), 11292-11307.
- **Lim, B., Beyhan, S., Meir, J. y Yildiz, F.H. (2006).** Cyclic-diGMP signal transduction systems in *Vibrio cholerae*: modulation of rugosity and biofilm formation. *Mol Microbiol* 60, 331–348.
- **Lin, B., Van Verseveld, H.W. y Roling, W.F. (2002).** Microbial aspects of anaerobic BTEX degradation. *Biomed Environ Sci* 15, 130-144.
- **López-Barragán, M.J., Carmona, M., Zamarro, M.T., Thiele, B., Boll, M., Fuchs, G., García, J.L. y Díaz, E. (2004).** The *bzd* gene cluster, coding for anaerobic benzoate catabolism, in *Azoarcus* sp. strain CIB. *J Bacteriol* 186, 5762-5774.
- **Lovley, D.R. (2003).** Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. *Nat Rev Microbiol* 1, 35-44.
- **Lowe, E.C., Baslé, A., Czjzek, M., Firbank, S.J. y Bolam, D.N. (2012).** A scissor blade-like closing mechanism implicated in transmembrane signaling in a *Bacteroides* hybrid two-component system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109, 7298-7303.
- **Luo, Y., Chen, B., Zhou, J., Sintim, H.O. y Dayie, T.K. (2014).** E88, a new cyclic-di-GMP class I riboswitch aptamer from *Clostridium tetani*, has a similar fold to

- the prototypical class I riboswitch, Vc2, but differentially binds to c-di-GMP analogs. *Mol Biosyst* 10(3), 384-390.
- **Lynch, J.B. y Sonnenburg, J.L. (2012).** Prioritization of a plant polysaccharide over a mucus carbohydrate is enforced by a *Bacteroides* hybrid two-component system. *Mol Microbiol.* 85(3), 478-491.
 - **Ma, Q., Yang, Z., Pu, M., Peti, W. y Wood, T.K. (2011).** Engineering a novel c-di-GMP-binding protein for biofilm dispersal. *Environ Microbiol* 13(3), 631-642.
 - **Magoc, T., Wood, D. y Salzberg, S.L. (2013).** EDGE-pro: Estimated Degree of Gene Expression in Prokaryotic Genomes. *Evol Bioinform Online* 9, 127-136.
 - **Martínez-Granero, F., Navazo, A., Barahona, E., Redondo-Nieto, M., González de Heredia, E., Baena, I., Martín-Martín, I., Rivilla, R. y Martín, M. (2014).** Identification of flgZ as a flagellar gene encoding a PilZ domain protein that regulates swimming motility and biofilm formation in *Pseudomonas*. *PLoS One* 49(2), e87608.
 - **Mascher, T., Helmann, J.D. y Uden, G. (2006).** Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 70(4), 910-938.
 - **Matilla, M.A., Espinosa-Urgel, M., Rodríguez-Herva, J.J., Ramos, J.L. y Ramos-González, M.I. (2007).** Genomic analysis reveals the major driving forces of bacterial life in the rhizosphere. *Genome Biol* 8(9), R179.
 - **Matilla, M.A., Travieso, M.L., Ramos, J.L. y Ramos-González, M.I. (2011).** Cyclic diguanylate turnover mediated by the sole GGDEF/EAL response regulator in *Pseudomonas putida*: its role in the rhizosphere and an analysis of its target processes. *Environ Microbiol* 13(7), 1745-1766.
 - **McFarland, N., McCarter, L., Artz, S. y Kustu, S. (1981).** Nitrogen regulatory locus "glnR" of enteric bacteria is composed of cistrons *ntrB* and *ntrC*: identification of their protein products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(4), 2135-2139.
 - **Mechichi, T., Stackebrandt, E., Gadon, N. y Fuchs, G. (2002).** Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria degrading aromatic compounds under denitrifying conditions, and description of *Thauera phenylacetica* sp. nov.,

- Thauera aminoaromatica* sp. nov. y *Azoarcus buckelii* sp. nov. Arch Microbiol 178, 26-35.
- **Miller, J.H. (1972).** Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbord Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York.
 - **Mizuno, T., Wurtzel, E.T. y Inouye, M. (1982).** Cloning of the regulatory genes (*ompR* and *envZ*) for the matrix proteins of the *Escherichia coli* outer membrane. J Bacteriol 150(3), 1462-1466.
 - **Mizuno, T. (1998).** His-Asp phosphotransfer signal transduction. J Biochem 123, 555-563.
 - **Morasch, B., Schink, B., Tebbe, C.C. y Meckenstock, R.U. (2004).** Degradation of o-xylene and m-xylene by a novel sulfate-reducer belonging to the genus Desulfotomaculum. Arch Microbiol 181, 407-417.
 - **Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S. y Olson, A.J. (2009).** AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. J Comput Chem 30(16), 2785-2791.
 - **Mosqueda, G., Ramos-González, M. I., y Ramos, J. L. (1999).** Toluene metabolism by the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* DOT-T1 strain, and its role in solvent impermeabilization. Gene 232, 69-76.
 - **Navarro, M.V., De, N., Bae, N., Wang, Q. y Sondermann, H. (2009).** Structural analysis of the GGDEF-EAL domain-containing c-di-GMP receptor FimX. Structure 17, 1104 –1116.
 - **Navarro, M.V., Newell, P.D., Krasteva, P.V., Chatterjee, D., Madden, D.R., O'Toole, G.A. y Sondermann, H. (2011).** Structural basis for c-di-GMP-mediated inside-out signaling controlling periplasmic proteolysis. PLoS Biol 9, e1000588.
 - **Niwa, D., Nishikawa, K. y Nakamura, H. (2011).** A hybrid two-component system of *Tannerella forsythia* affects autoaggregation and post-translational modification of surface proteins. FEMS Microbiol Lettr 318(2), 189-196.
 - **O'Toole, G.A. y Kolter, R. (1998).** Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Mol Microbiol 28(3), 449-641.

- **Panke, S., de Lorenzo, V., Kaiser, A., Witholt, B. y Wubbolts, M.G. (1999).** Engineering of a stable whole-cell biocatalyst capable of (S)-styrene oxide formation for continuous two-liquid-phase applications. *Appl Environ Microbiol.* 65(12), 5619-5623.
- **Parales, R.E. y Resnick, S.M. (2006).** Aromatic ring hydroxylating dioxygenases. p. 287-340. En J. L. Ramos and R. C. Levesque (eds.), *Pseudomonas* vol. 4: Molecular biology of emerging issues. Springer, Países Bajos.
- **Parkinson, J.S., and Kofoed, E.C. (1992).** Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet.* 26, 71-112.
- **Pérez-Pantoja, D., Donoso, R., Agulló, L., Córdova, M., Seeger, M., Pieper, D.H. y González, B. (2012).** Genomic analysis of the potential for aromatic compounds biodegradation in Burkholderiales. *Environ Microbiol* 14(5), 1091-1117.
- **Pesavento, C. y Hengge, R. (2009).** Bacterial nucleotide-based second messengers. *Curr Opin Microbiol* 12(2), 170-176.
- **Peters, F., Rother, M. y Boll, M. (2004).** Selenocysteine-containing proteins in anaerobic benzoate metabolism of *Desulfococcus multivorans*. *J Bacteriol* 186, 2156-2163.
- **Pinkart, H.C, Wolfram, J.W., Rogers, R., White, D.C. (1996).** Cell Envelope Changes in Solvent-Tolerant and Solvent-Sensitive *Pseudomonas putida* Strains following Exposure to o-Xylene. *Appl Environ Microbiol* 62(3), 1129-1132.
- **Pratt, J.T., Tamayo, R., Tischler, A.D. y Camilli, A. (2007).** PilZ domain proteins bind cyclic diguanylate and regulate diverse processes in *Vibrio cholerae*. *J Biol Chem* 282, 12860 –12870.
- **Raghavan, V. y Groisman, E.A. (2010).** Orphan and hybrid two-component system proteins in health and disease. *Curr Opin Microbiol* 13(2), 226-231.
- **Rabus, R., Kube, M., Heide, r J., Beck, A., Heitmann, K., Widdel, F. y Reinhardt R. (2005).** The genome sequence of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch Microbiol* 183(1), 27-36.
- **Rabus, R., Trautwein, K. y Wöhlbrand, L. (2014).** Towards habitat-oriented systems biology of "Aromatoleum aromaticum" EbN1: chemical sensing,

- catabolic network modulation and growth control in anaerobic aromatic compound degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 98(8), 3371-3388.
- **Ramos, J.L., Duque, E., Gallegos, M.T., Godoy, P., Ramos-González, M.I., Rojas, A., Teran, W. y Segura, A. (2002).** Mechanisms of solvent tolerance in Gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Microbiol* 56, 743-768.
 - **Ravcheev, D.A., Godzik, A., Osterman, A.L. y Rodionov, D.A. (2013).** Polysaccharides utilization in human gut bacterium *Bacteroides thetaiotaomicron*: comparative genomics reconstruction of metabolic and regulatory networks. *BMC Genomics*. 14:873.
 - **Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G. y Mesirov, J.P. (2011).** Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* 29(1), 24-26.
 - **Romeo, T., Gong, M., Liu, M.Y. y Brun-Zinkernagel, A.M. (1993).** Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. *J Bacteriol* 175(15), 4744-4755.
 - **Römling, U., Gomelsky, M. y Galperin, M. Y. (2005).** C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Mol Microbiol* 57, 629-639.
 - **Römling, U. y Amikam, D. (2006).** Cyclic di-GMP as a second messenger. *Curr Opin Microbiol* 9, 218-228.
 - **Römling, U. y Simm, R. (2009).** Prevailing concepts of c-di-GMP signalling. *Contib Microbiol* 16, 161-181.
 - **Römling, U., Galperin, M. Y. y Gomelsky, M. (2013).** Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol Mol Biol Rev.* 77(1), 1-52.
 - **Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., Braun, S., de Vroom, E., van der Marel, G.A., van Boom, J.H. y Benziman, M. (1987).** Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* 325, 279 –281.
 - **Ruíz, R., Aranda-Olmedo, M.I., Domínguez-Cuevas, P., Ramos-González, M.I., and Marqués, S. (2004).** Transcriptional regulation of the toluene catabolic

- pathways. In *Pseudomonas*, vol. 2. Ramos, J.L. (ed.). New York, NY, USA: Kluwer Academic/Plenum publishers, pp. 509–537.
- **Russell, M.H., Bible, A.N., Fang, X., Gooding, J.R., Campagna, S.R., Gomelsky, M. y Alexandre, G. (2013).** Integration of the second messenger c-di-GMP into the chemotactic signaling pathway. *MBio* 4(2), e00001-13.
 - **Ryan, R.P., Fouhy, Y., Lucey, J.F., Crossman, L.C., Spiro, S., He, Y.W., Zhang, L.H., Heeb, S., Camara, M., Williams, P. y Dow, J.M. (2006).** Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6712–6717.
 - **Ryan, R.P. (2013).** Cyclic di-GMP signaling and the regulation of bacterial virulence. *Microbiol* 159, 1286-1297.
 - **Ryjenkov, D.A., Simm, R., Römling, U. y Gomelsky, M. (2006).** The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP. The PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *J Biol Chem* 281, 30310–30314.
 - **Sambrook, J. y Russell, D. W. (2001).** Molecular cloning: a laboratory manual / Joseph Sambrook, David W. Russell. Cold Spring Harbor, Nueva York.
 - **Santos, P. M., L. Leoni, I. Di Bartolo, y E. Zennaro. (2002).** Integration host factor is essential for the optimal expression of *styABCD* operon in *Pseudomonas fluorescens* ST. *Res. Microbiol.* 153, 527-536.
 - **Sarand, I., Österberg, S., Holmqvist, S., Holmfeldt, P., Skärfstad, E., Parales, R. E. y Shingler, V. (2008).** Metabolism-dependent taxis towards (methyl)phenols is coupled through the most abundant of three polar localized Aer-like proteins of *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* 10, 1320-1334.
 - **Schirmer, T. y Jenal, U. (2009).** Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. *Nat Rev Microbiol* 7(10), 724-35.
 - **Schmidt, A.J., Ryjenchov, D.A. y Gomelsky, M. (2005).** The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. *J Bacteriol* 187(14), 4774-4781.
 - **Schneider, C.A., Rasband, W.S. y Eliceiri, K.W. (2012).** NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9(7), 671-675.

- **Segura, A., Godoy, P., van Dillewijn, P., Hurtado, A., Arroyo, N., Santacruz, S. y Ramos, J.L. (2005).** Proteomic analysis reveals the participation of energy- and stress-related proteins in the response of *Pseudomonas putida* DOT-T1E to toluene. *J Bacteriol* 187(17), 5937-5945.
- **Shinoda, Y., Akagi, J., Uchihashi, Y., Hiraishi, A., Yukawa, H., Yurimoto, H., Sakai, Y. y Kato, N. (2005).** Anaerobic degradation of aromatic compounds by *Magnetospirillum* strains: isolation and degradation genes. *Biosci Biotechnol Biochem* 69, 1483-1491.
- **Sikkema, J., Poolman, B., Konings, W. N. y de Bont J. A. (1992).** Effects of the membrane action of tetralin on the functional and structural properties of artificial and bacterial membranes. *J Bacteriol* 174:2986-2892.
- **Silva-Jiménez, H., Ramos, J.L. y Krell, T. (2012).** Construction of a prototype two-component system from the phosphorelay system TodS/TodT. *Protein Eng Des Sel.* 25(4), 159-169.
- **Silva-Jiménez, H., Ortega, A., García-Fontana, C. Ramos, J.L. y Krell, T. (2014).** Multiple signals modulate the activity of the complex sensor kinase TodS. *Microb Biotechnol.* Online 1 Jul.
- **Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M. y Römling, U. (2004).** GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol* 53, 1123–1134.
- **Sondermann, H., Shikuma, N.J. y Yildiz, F.H. (2012).** You’ve come a long way: c-di-GMP signaling. *Curr Opin Microbiol* 15, 140 –146.
- **Song, B., Haggblom, M.M., Zhou, J., Tiedje, J.M. y Palleroni, N.J. (1999).** Taxonomic characterization of denitrifying bacteria that degrade aromatic compounds and description of *Azoarcus toluovorans* sp. nov. and *Azoarcus toluclasticus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49 Pt 3, 1129-1140.
- **Sonnenburg, E.D., Sonnenburg, J.L., Manchester, J.K., Hansen, E.E., Chiang, H.C. y Gordon, J.I. (2006).** A hybrid two-component system protein of a prominent human gut symbiont couples glycan sensing in vivo to carbohydrate metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 8834-8839.

- **Sonnenburg, E.D., Zheng, H., Joglekar, P., Higginbottom, S.K., Firbank, S.J., Bolam, D.N. y Sonnenburg, J.L. (2010).** Specificity of polysaccharide use in intestinal bacteroides species determines diet-induced microbiota alterations. *Cell* 141(7), 1241-1252.
- **Sourjik, V., Wingreen, N.S. (2012).** Responding to chemical gradients: bacterial chemotaxis. *Curr Opin Cell Biol* 24(2), 262-268.
- **Spormann, A.M. y Widdel, F. (2000).** Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation* 11, 85-105.
- **Springer, N., Ludwig, W., Philipp, B. y Schink, B. (1998).** *Azoarcus anaerobius* sp. nov., a resorcinol-degrading, strictly anaerobic, denitrifying bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 48 Pt 3, 953-956.
- **Srivastava, D., Harris, R.C. y Waters, C.M. (2011).** Integration of cyclic di-GMP and quorum sensing in the control of vpsT and aphA in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* 193(22), 6331-6341.
- **Srivastava, D., Hsieh, M.L., Khataokar, A., Neiditch, M.B. y Waters, C.M. (2013).** Cyclic di-GMP inhibits *Vibrio cholerae* motility by repressing induction of transcription and inducing extracellular polysaccharide production. *Mol Microbiol* 90(6), 1262-1276.
- **Stephenson, K. y Hoch, J.A. (2001).** PAS-A domain of phosphorelay sensor kinase A: a catalytic ATP-binding domain involved in the initiation of development in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(26), 15251-15256.
- **Stewart, V. (1982).** Requirement of Fnr and NarL functions for nitrate reductase expression in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 151(3), 1320-1325.
- **Stewart, R. C. (2010).** Protein histidine kinases: assembly of active sites and their regulation in signaling pathways. *Curr Opin Microbiol* 13, 133-141.
- **Stock, A., Koshland, D.E. y Stock, J. (1985).** Homologies between the *Salmonella typhimurium* CheY protein and proteins involved in the regulation of chemotaxis, membrane protein synthesis, and sporulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(23), 7989-7993.
- **Stock, J.B., Ninfa, A.J. y Stock, A.M. (1989).** Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev* 53(4), 450-490.

- **Stock, A.M., Robinson, V.L. y Goudreau, P.N. (2000).** Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* 69, 183-215.
- **Sudarsan, N., Lee, E.R., Weinberg, Z., Moy, R.H., Kim, J.N., Link, K.H. y Breaker, R.R. (2008).** Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. *Science* 321, 411–413.
- **Sultan, S.Z., Pitzer, J.E., Boquoi, T., Hobbs, G., Miller, M.R. y Motaleb, M.A. (2011).** Analysis of the HD-GYP domain cyclic dimeric GMP phosphodiesterase reveals a role in motility and the enzootic life cycle of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 79, 3273–3283.
- **Sundriyal, A., Massa, C., Samoray, D., Zehender, F., Sharpe, T., Jenal, U. y Schirmer, T. (2014).** Inherent regulation of EAL domain-catalyzed hydrolysis of second messenger cyclic di-GMP. *J Biol Chem* 289(10), 6978-6990.
- **Swank, R.T. y Munkres, K.D. (1971).** Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Anal Biochem* 39, 462-477.
- **Swoboda-Colberg, N.G. (1995).** Chemical contamination of the environment: sources, types, and fates of synthetic organic chemicals. p.27-74. In: L.Y. Young y C.E. Cerniglia, *Microbial transformations and degradation of toxic organic chemicals*. Wiley-Liss, Inc., New York.
- **Tal, R., Wong, H.C., Calhoon, R., Gelfand, D.H., Fear, A.L., Volman, G., Mayer, R., Ross, P., Amikam, D., Weinhouse, H., Cohen, A., Sapir, S., Ohana, P. y Benziman, M. (1998).** Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *J. Bacteriol* 180, 4416–4425.
- **Tamayo, R., Pratt, J. T. y Camilli, A. (2007).** Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 61, 131-148.
- **Tatusov, R.L., Koonin, E.V. y Lipman, D.J. (1997).** A genomic perspective on protein families. *Science* 278(5338), 631-637.
- **Taylor, B.L. y Zhulin, I.B. (1999).** PAS Domains: Internal Sensors of Oxygen, Redox Potential, and Light. *Microbiol Mol Biol Rev* 63(2), 479–506.

- **Tchigvintsev, A., Xu, X., Singer, A., Chang, C., Brown, G., Proudfoot, M., Cui, H., Flick, R., Anderson, W.F., Joachimiak, A., Galperin, M.Y., Savchenko, A. y Yakunin, A.F. (2010).** Structural insight into the mechanism of c-di-GMP hydrolysis by EAL domain phosphodiesterases. *J Mol Biol* 402, 524–538.
- **Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22(22), 4673-4680.
- **Timmis, K.N., Pieper, D.H. (1999).** Bacteria designed for bioremediation. *Trends Biotechnol* 17(5), 200-204.
- **Tischler, A.D. y Camilli, A. (2004).** Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol Microbiol* 53(3), 857-869.
- **Tischler, A.D. y Camilli, A. (2005).** Cyclic diguanylate regulates *Vibrio cholera* virulence gene expression. *Infect Immun* 73, 5873–5882.
- **Torres, S., Pandey, A. y Castro, G.R. (2009).** Organic solvent adaptation of Gram positive bacteria: applications and biotechnological potentials. *Biotechnol Adv* 29(4), 442-452.
- **Townsend, G.E., Raghavan, V., Zwir, I. y Groisman, E.A. (2013).** Intramolecular arrangement of sensor and regulator overcomes relaxed specificity in hybrid two-component systems. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(2), 161-169.
- **Trautwein, K., Kühner, S., Wöhlbrand, L., Halder, T., Kuchta, K., Steinbüchel, A. y Rabus, R. (2008).** Solvent stress response of the denitrifying bacterium "*Aromatoleum aromaticum*" strain EbN1. *Appl Environ Microbiol* 74(8), 2267-2274.
- **Tropel, D., y van der Meer, J. R. (2004).** Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 474-500.
- **Ulrich, E., Koonin, E.V., y Zhulin, I.B. (2005).** One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol* 13, 52–56.
- **Vaillancourt, F.H., Bolin, J.T. y Eltis, L.D. (2006).** The ins and outs of ring cleaving dioxygenases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 41, 241-267.

- **Valderrama, J.A., Durante-Rodríguez, G., Blázquez, B., García, J.L., Carmona, M. y Díaz, E. (2012).** Bacterial degradation of benzoate: cross-regulation between aerobic and anaerobic pathways. *J Biol Chem* 287(13), 10494-10508.
- **Valderrama, J.A., Shingler, V., Carmona, M. y Díaz, E. (2014).** AccR is a master regulator involved in carbon catabolite repression of the anaerobic catabolism of aromatic compounds in *Azoarcus* sp. *CIB. J Biol Chem* 289(4), 1892-1904.
- **Velasco, A., Alonso, S., García, J.L., Perera, J. y Díaz, E. (1998).** Genetic and functional analysis of the styrene catabolic cluster of *Pseudomonas* sp. Strain Y2. *J Bacteriol* 180, 1063-1071.
- **Vilchez-Vargas, R., Junca, H. y Pieper, D.H. (2010).** Metabolic networks, microbial ecology and 'omics' technologies: towards understanding in situ biodegradation processes. *Environ Microbiol* 12(12), 3089-3104.
- **Wassmann, P., Chan, C., Paul, R., Beck, A., Heerklotz, H., Jenal, U. y Schirmer, T. (2007).** Structure of BeF₃ modified response regulator PleD: implications for diguanylate cyclase activation, catalysis, and feedback inhibition. *Structure* 15, 915-927.
- **Weber, F.J., de Bont, J.A.M. (1996).** Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1286, 225-245.
- **West, A.H. y Stock, A.M. (2001).** Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* 26(6), 369-376.
- **Wirth, R., Friesenegger, A. y Fiedler, S. (1989).** Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation. *Mol Gen Genet* 216, 175-177.
- **Whitworth D.E. y Cock P.J. (2009).** Evolution of prokaryotic two-component systems: insights from comparative genomics. *Amino Acids* 37(3), 459-466.
- **Wilson, K. (1997).** *Current Protocols in Molecular Biology*. F. M. Ausubel (sd). John Wiley & Sons Inc., Nueva Jersey.
- **Wöhlbrand, L., Kallerhoff, B., Lange D., Hufnagel, P., Thiermann, J., Reinhardt, R. y Rabus, R. (2007).** Functional proteomic view of metabolic

- regulation in "Aromatoleum aromaticum" strain EbN1. *Proteomics* 7(13), 2222-2239.
- **Wolanin, P.M., Thomason, P.A., y Stock, J.B. (2002).** Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome biology* 3(10), REVIEWS3013.
 - **Wuichet, K., Cantwell, B.J. y Zhulin, I.B. (2010).** Evolution and phyletic distribution of two-component signal transduction systems. *Curr Opin Microbiol* 13(2), 219-225.
 - **Yang, F., Tian, F., Li, X., Fan, S., Chen, H., Wu, M., Yang, C.H. y He, C. (2014).** The degenerate EAL-GGDEF domain protein Filp functions as a cyclic di-GMP receptor and specifically interacts with the PilZ-domain protein PXO_02715 to regulate virulence in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol Plant Microbe Interact* 27(6), 578-589.
 - **Yaryura, P.M., Conforte, V.P., Malamud, F., Roeschlin, R., De Pino, V., Castagnaro, A.P., McCarthy, Y., Dow, J.M., Marano, M.R. y Vojnov, A.A. (2014).** XbmR, a new transcription factor involved in the regulation of chemotaxis, biofilm formation and virulence in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Environ Microbiol* Oct 24.
 - **Yen, K.M., Karl, M.R., Blatt, L.M., Simon, M.J., Winter, R.B., Fausset, P.R., Lu, H.S., Harcourt, A.A. y Chen, K.K. (1991).** Cloning and characterization of a *Pseudomonas mendocina* KR1 gene cluster encoding toluene-4-monooxygenase. *J Bacteriol* 173(17), 5315-5327.
 - **Zhang, Y. (2008).** I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*. 9, 40.
 - **Zhou, J., Fries, M.R., Chee-Sanford, J.C. y Tiedje, J.M. (1995).** Phylogenetic analyses of a new group of denitrifiers capable of anaerobic growth of toluene and description of *Azoarcus tolulyticus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 45, 500-506.
 - **Zink, K.G. y Rabus, R. (2010).** Stress-induced changes of phospholipids in betaproteobacterium *Aromatoleum aromaticum* strain EbN1 due to alkylbenzene growth substrates. *J Mol Microbiol Biotechnol* 18(2), 92-101.